

**Analyses biochimiques et développement de techniques permettant d'étudier les
propriétés enzymatiques et la régulation de la télomérase chez
la levure *Saccharomyces cerevisiae*.**

Par

Nancy Laterreur

Département de Microbiologie et d'Infectiologie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.) en Microbiologie

Mars 2007



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-31414-2

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-31414-2

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

TABLE DES MATIÈRES

Table des matières	I
Liste des Illustrations (tableaux et figures)	IV
Liste des Sigles, Abréviations et Symboles	VI
Liste des Annexes	XI
Résumé	XII

INTRODUCTION

Les télomères	1
Organisation du télomère	2
Fonctions des télomères	4
La télomérase	7
Composantes de la télomérase	9
<i>La sous-unité catalytique</i>	10
<i>Les facteurs accessoires</i>	11
<i>L'ARN de la télomérase</i>	14
Mécanismes d'action de la télomérase	21
Régulation de la télomérase	22
Objectifs principaux	25
Purification de protéines	27
Purification de la télomérase	28
Purification de protéines recombinantes en bactérie	33

CHAPITRE I

PRÉAMBULE	36
I.I MATÉRIEL ET MÉTHODES	37
Souches utilisées	37
Extraction de protéines totales	38
Immunoprécipitation	39

Immunobuvardage de type Western	40
Essai d'activité de télomérase <i>in vitro</i>	41
Marquage d'oligonucléotides au [γ -32P] ATP	43
I.II RÉSULTATS	43

CHAPITRE II

PRÉAMBULE	52
II.I MATÉRIEL ET MÉTHODES	53
Souches utilisées	53
Extraction de protéines totales	53
Purification sur colonne DEAE	53
Immunobuvardage de type Western	54
Extraction d'ARN	55
RT-PCR (Reverse Transcription PCR)	55
Essai d'activité de télomérase modifié	57
II.II RÉSULTATS	58

CHAPITRE III

PRÉAMBULE	76
III.I MATÉRIEL ET MÉTHODES	77
Techniques de clonage	77
Plasmides	79
<i>Constructions</i>	79
<i>Minipréparation d'ADN plasmidique</i>	82
<i>Clonage dans pGEX-4T-3</i>	82
Expression de GST-FrEst1p	83
<i>Transformation dans les bactéries BL21-CodonPlus (DE3)....</i>	83
<i>Induction à l'IPTG</i>	85
<i>Préparation de l'extrait total de protéines</i>	86

Purification de Gst-FrEst1p	86
Purification sur billes de glutathione	86
<i>Purification « par batch »</i>	87
<i>Purification sur colonne GSTrap FF</i>	89
Purification sur résines échangeuses d'ion	90
Analyse sur SDS-PAGE 15%	91
III.II RÉSULTATS	92
Tests d'induction	92
Purification sur sépharose de glutathione	93
Séparation de Gst et FrEst1p	94
 DISCUSSION ET CONCLUSIONS	
RÔLE DE RNT1p DANS LA RÉGULATION DE LA TÉLOMÉRASE	104
PURIFICATION DE LA TÉLOMÉRASE	108
PURIFICATION DU FRAGMENT D'EST1p	113
 REMERCIEMENTS	117
 LISTE DES RÉFÉRENCES	118
 ANNEXE 1	133

LISTE DES ILLUSTRATIONS (TABLEAUX ET FIGURES)

- Tableau 1 :** Différentes étiquettes utilisées pour la purification de protéines eucaryotes.
- Figure 1 :** Séquence télomérique du brin 5'-3' des chromosomes chez certains organismes eucaryotes.
- Figure 2 :** Organisation des séquences télomériques au bout d'un chromosome chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.
- Figure 3 :** Structure nucléoprotéique du capuchon télomérique de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Figure 4 :** La réplication semi-conservative de l'ADN engendre une asymétrie aux télomères.
- Figure 5 :** Complexe enzymatique de la télomérase chez *Saccharomyces cerevisiae* et *Homo sapiens*.
- Figure 6 :** Domaines fonctionnels de la protéine Est2p.
- Figure 7 :** Diagramme représentant les principales caractéristiques de TLC1.
- Figure 8 :** Modèle de positionnement de la matrice de TLC1 sur l'extension 5' du télomère.
- Figure 9 :** Domaines fonctionnels de la protéine Est2p, la sous-unité catalytique de la télomérase chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.
- Figure 10 :** Cycle de réaction de la télomérase.
- Figure 11 :** Stratégie et caractéristiques de purification de la télomérase sur colonne DEAE.
- Figure 12 :** Caractérisation des phénotypes télomériques reliés à la délétion de *RNT1*.
- Figure 13 :** Utilisation de la souche exprimant l'allèle thermosensible *rnt1-ts* afin de déterminer la spécificité des effets de la ribonucléase sur la télomérase à 37°C.
- Figure 14 :** Détermination de la spécificité de Rnt1p sur la télomérase par l'utilisation d'une souche exprimant l'allèle thermosensible *rnt1-ts* à température restrictive de 33°C.
- Figure 15 :** Chromatogramme de la purification de la télomérase sur colonne DEAE.
- Figure 16 :** Immunobuvardage de type Western sur les échantillons obtenus suite à la purification partielle de la télomérase sur colonne DEAE.
- Figure 17 :** Schéma représentant la réaction de RT-PCR et les amorces utilisées.

- Figure 18 :** RT-PCR effectuée sur l'ARN extrait d'un extrait de protéines S-100 à titre de contrôle.
- Figure 19 :** RT-PCR contrôle où les produits de la réaction de RT ont été purifiés sur colonne avant la réaction de PCR.
- Figure 20 :** Réactions de RT-PCR effectuées sur l'ARN extrait des fractions obtenues lors de la purification sur colonne DEAE.
- Figure 21 :** Essai d'activité de télomérase *in vitro* effectué sur les fractions de protéines obtenues lors de la purification sur colonne DEAE.
- Figure 22 :** Essais d'activité de télomérase *in vitro* effectués en variant les conditions de réactions.
- Figure 23 :** Tests d'activité de télomérase sur immunoprécipitations faits en présence des différentes concentrations de sel utilisé lors de la purification DEAE.
- Figure 24 :** Essai d'activité de télomérase sur immunoprécipitations de fractions DEAE dialysées.
- Figure 25 :** Essai d'activité de télomérase effectué sur des immunoprécipitations des fractions diluées jusqu'à la plus basse concentration de protéines.
- Figure 26 :** Schéma représentant les étapes de purification de Gst-FrEst1p.
- Figure 27 :** Constructions plasmidiques utilisées pour la purification de Gst-FrEst1p.
- Figure 28 :** Tests d'induction à l'IPTG.
- Figure 29 :** Étapes de purification sur la sépharose de glutathione.
- Figure 30 :** Comparaison des 2 méthodes pour la purification sur résine de glutathione.
- Figure 31 :** Tentatives de séparation des protéines Gst et FrEst1p par différents moyens proposés par GE Healthcare.
- Figure 32 :** Purification sur résine de CM sépharose.
- Figure 33 :** Purification sur résine de SP sépharose.

LISTE DES SIGLES, ABBRÉVIATIONS ET SYMBOLES

Δ : *delta*, identifie une délétion

$^{\circ}\text{C}$: degré Celcius

μg : microgramme

μl : microlitre

μm : micromètre

μM : micromolaire

2X-YT : milieu composé de 16% (m/v) Tryptone, 10% (m/v) extrait de levure et 5% (m/v) NaCl

3': extrémité 3' d'un nucléotide, groupement OH libre sur le carbone 3' du sucre

5': extrémité 5' d'un nucléotide, groupement OH libre ou ester phosphate sur le carbone 5' du sucre

A : adénosine

ADN ou DNA: acide déoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ARN ou RNA : acide ribonucléique

ARNm: ARN messenger

ARNr : ARN ribosomal

ATP : adénosine triphosphate

b : base(s)

C : cytosine

ChIP : « chromatin immunoprecipitation » ou immunoprécipitation de la chromatine

Ci : Curie

cm : centimètre

CM: carboxyméthyle

cpm : compte par minute

C-terminal : carboxy-terminal

ctrl : contrôle

dATP : déoxyadénosine triphosphate

db : double brin

dCTP : déoxycytidine triphosphate

DEAE: diethylaminoéthyle

dGTP : déoxyguanosine triphosphate

DNase : déoxyribonucléase, enzyme qui dégrade l'ADN

dNTP : déoxynucléoside triphosphate

DO: densité optique

DTT: dithiothréitol

ECL : « Enzymatic Chemiluminescence », chimioluminescence enzymatique

EDTA: tétraacétate d'éthylènediamine disodium

EST: « Ever Shorter Telomeres », télomères toujours plus courts

FPLC: « Fast Protein Liquid Chromatography », chromatographie rapide de protéines en phase liquide

g : unité de rotation gravitationnelle

G: guanosine

GST: glutathione S-transférase

h: heure

His: Histidine

Ig: immunoglobuline

IgG: immunoglobuline de type G

IP : immunoprécipitation

IPTG : Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranoside

kb : kilobase

KCl : chlorure de potassium

kDa: kiloDalton

KH₂PO₄ : phosphate de potassium monobasique

kpb: kilopaire de base

LB: milieu Luria Broth (1% m/v Bacto-tryptone, 1% m/v NaCl, 0.5% m/v extrait de levure)

LiCl : chlorure de lithium

M : molaire

mg: milligramme

MgCl₂ : dichlorure de magnésium

min : minute

mini-prep : mini-préparation d'ADN plasmidique

ml : millilitre

mmole : millimole

Mr : Marqueur

m/v : masse pour volume

Na₂HPO₄ : phosphate de sodium dibasique

NaCl : chlorure de sodium

NaOAc : acétate de sodium

NEB : New England Biolabs

ng : nanogramme

NHEJ: « Non-Homologous End-Joining », ligation de bouts non-homologues

nm: nanomètre

nM: nanomolaire

NMD :« Non-sense Mediated Decay », dégradation des ARN messagers lors de la reconnaissance d'un codon stop prématuré

NP40: Nonidet P-40

nt: nucléotide

N-terminal: amino-terminal

ORF: « Open Reading Frame », cadre ouvert de lecture

pb: paire de base

PBS: « phosphate-buffered saline », tampon salin de phosphates

PBS-T : tampon salin de phosphates avec 0.1% Tween-20

PCR: « Polymerase Chain Reaction », Réaction de Polymérisation en Chaîne

pH : mesure de l'acidité d'une solution

ProA: Protéine A

Q: « quaternary amine », amine quaternaire

RNAse : ribonucléase, enzyme dégradant l'ARN

RNasin : inihibiteur de ribonucléase

RT-PCR : « Reverse Transcription PCR », transcription inverse suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne

sb : simple brin

SDS: sodium dodécyl sulfate

SDS-PAGE:« SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis », électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS

snoRNA: « small nucleolar RNA », petit ARN nucléolaire

snRNA: « small nuclear RNA », petit ARN nucléaire

SP: sulfopropyl

T: Thymidine

TAE: 40mM Tris, 20 mM acide acétique glaciale, 1mM EDTA pH 8.0

TAP : « Tandem Affinity Purification », étiquette utilisée pour la purification en tandem

Taq : ADN polymérase provenant de *Thermophilus aquaticus*

TMG: triméthylguanosine

TPE: « Telomere Position Effect », effet de positionnement aux télomères

ts: thermosensible

TTP : thymidine triphosphate

U : Uridine ou unité

v/v : volume pour volume

V : Volt

W: Watts

pmol : picomole

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1:

Larose S., Laterreur N., Ghazal G., Gagnon J., Wellinger R.J. & Abou Elela S. *RNase III-Dependent Regulation of Yeast Telomerase*. 2006. Soumis à: Journal of Biological Chemistry.

Analyses biochimiques et développement de techniques permettant d'étudier les propriétés enzymatiques et la régulation de la télomérase chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Par
Nancy Laterreur

Département de Microbiologie et d'Infectiologie
Mémoire présenté à la Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.) en Microbiologie
Novembre 2006

Mots-clés : télomérase, levure, Rnt1p, purification de télomérase.

RÉSUMÉ

La télomérase est une ribonucléoprotéine à transcriptase inverse essentielle au maintien des télomères, extrémités des chromosomes eucaryotes. Les télomères sont des éléments essentiels pour assurer la stabilité et l'intégrité des chromosomes puisque plusieurs protéines s'y lient et forment un capuchon protecteur au bout du chromosome, le protégeant ainsi contre la dégradation et les fusions bout-à-bout qui pourraient survenir et causer plusieurs problèmes, incluant la mort cellulaire. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, plusieurs études ont identifié les éléments essentiels au fonctionnement de la télomérase. Ainsi, on a déterminé que la molécule d'ARN TLC1 ainsi que la protéine

Est2p, sous-unité catalytique de la télomérase, formaient le complexe enzymatique minimal pour la fonction de la télomérase *in vitro*. Par contre, les protéines Est1p, Est3p et Cdc13p s'ajoutent au complexe minimal pour former un holoenzyme fonctionnel *in vivo*. Toutes ces protéines sont essentielles *in vivo* et si l'une d'elles est manquante, la cellule est vouée à la mort cellulaire après quelques générations dû au raccourcissement graduel des télomères à chaque division cellulaire. Dans cette étude, nous présentons différents projets qui ont pour but de caractériser de façon biochimique l'holoenzyme de la télomérase et de l'étudier dans son état natif. De plus, un nouveau mécanisme de régulation de la télomérase est proposé et se fait via la ribonucléase III Rnt1p. Les résultats obtenus suggèrent que Rnt1p agit à titre de régulateur négatif de la télomérase et ceci dans une période précise du cycle cellulaire. Rnt1p diminuerait l'expression des sous-unités de la télomérase pour ainsi réguler son activité.

Par ailleurs, dans le but d'étudier les aspects biochimiques de la télomérase et d'identifier de possibles partenaires inconnus, nous avons entamé la purification de l'holoenzyme dans son état natif. La purification s'est avérée plus difficile que prévu et n'a pas donné les résultats escomptés. Finalement, toujours dans l'optique d'étudier la télomérase dans son état natif (sans l'utilisation d'étiquettes protéiques), nous avons entamé un projet d'expression et de purification d'une portion d'une des sous-unités de la télomérase, Est1p, dans le but d'élever des anticorps. Cette purification s'est effectuée en bactéries, à l'aide du système de la protéine de fusion GST. Il s'est avéré que la purification du fragment de la protéine Est1p nécessitait plusieurs étapes de purification plutôt que la méthode classique de purification à l'aide de l'étiquette GST.

INTRODUCTION

LES TÉLOMÈRES

Vers la fin des années 1930s, le généticien Herman J. Muller a introduit pour la première fois le mot télomère (« telo » en grec = fin) grâce aux travaux qu'il a effectués sur les chromosomes de la drosophile. Ces travaux ont mené à l'observation que des délétions ou des anomalies induites par des irradiations aux rayons X dans l'ensemble du génome étaient quasi-indéetectables dans la partie terminale des chromosomes (Muller, 1938). Les conclusions tirées par le Dr Muller furent que les télomères des chromosomes possédaient une structure particulière qui protégeait le chromosome. Peu de temps après, Barbara McClintock a confirmé les résultats obtenus par Muller en étudiant les cassures double brin du maïs. Elle a dénoté que lorsque les chromosomes étaient brisés, les endroits ayant subi les cassures double brin pouvaient fusionner entre eux mais que les parties terminales des chromosomes étaient stables et exemptes de fusions (McClintock, 1939). Ces travaux ont lancé la recherche sur les télomères et leur mode de fonctionnement au niveau de la protection et de la stabilité des chromosomes. De nos jours, les télomères sont considérés comme étant des structures composées d'ADN non-codant et de protéines qui forment, ensemble, un capuchon protecteur essentiel au maintien des chromosomes eucaryotes.

Organisation du télomère

Chez la plupart des eucaryotes, l'ADN des télomères est composé de séquences répétitives G-riches hautement conservées. La première caractérisation des séquences télomériques a été effectuée en 1978 chez l'organisme *Tetrahymena thermophila* par le groupe de Gall (Blackburn et Gall, 1978). Depuis cette caractérisation, plusieurs organismes ont vu leur ADN télomérique séquencé (figure 1).

Organismes	Séquences répétées	Abréviation
Protozoaires		
<i>Tetrahymena</i>	TTGGGG	T ₂ G ₄
<i>Trypanosoma</i>	TTAGGG	T ₂ AG ₃
Champignons		
<i>Saccharomyces</i>	TGTGGTGTGGG	(TG) ₁₋₆ TG ₂₋₃
Vertébrés		
<i>Homo sapiens</i>	TTAGGG	T ₂ AG ₃
<i>Mus spp</i>	TTAGGG	T ₂ AG ₃

Wellinger R.J. & Sen D. 1997

Figure 1 : Séquence télomérique du brin 5'-3' des chromosomes chez certains organismes eucaryotes (adapté de (Wellinger et Sen, 1997))

Suite à ces travaux, plusieurs groupes se sont lancés dans l'analyse moléculaire des télomères afin de déterminer les constituants présents au bout des chromosomes (Blackburn et Gall, 1978; Klobutcher, 1977 ; Zakian, 1989). C'est alors que les télomères ont été décrits comme étant des structures nucléoprotéiques, composés d'ADN et de protéines spécifiques, présents à toutes les extrémités des chromosomes. Chez la plupart des organismes étudiés, les télomères faisaient donc partie d'un complexe, le télosome, regroupant les répétitions d'ADN télomérique double brin, une extension 3' simple brin G-riche ainsi que des protéines liées à

l'ADN (Zakian, 1995). Le télosome est considéré comme un capuchon télomérique qui protège non seulement les extrémités mais également tout le chromosome.

Les télomères de la levure *Saccharomyces cerevisiae* sont, tout comme pour la majorité des organismes eucaryotes, de longueur hétérogène. L'ADN du télomère mesure environ 250 à 300 pb et est constitué de séquences répétitives dégénérées (TG)₁₋₆TG₂₋₃ (simplifié TG₁₋₃) (Shampay *et al.*, 1984). La longueur de l'extension 3' simple brin G-riche varie selon la phase du cycle cellulaire. Il a été démontré que cette extension est d'une longueur d'environ 30 nucléotides en fin de phase S (Wellinger *et al.*, 1993). Tout récemment, de nouvelles techniques plus sensibles ont permis de mesurer la taille de l'extension G-riche dans les autres phases du cycle cellulaire et celle-ci est d'une longueur d'environ 12 à 14 nucléotides (Larrivee *et al.*, 2004). Un schéma représentant l'organisation générale du télomère chez la levure est illustré à la figure 2.

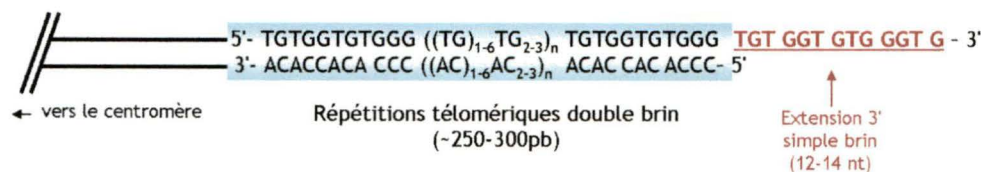


Figure 2 : Organisation des séquences télomériques au bout d'un chromosome chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

À l'extrémité des chromosomes, la structure primaire des télomères est formée d'une partie d'ADN double brin (~250 à 300pb) et d'une courte extension simple brin G-riche sur le brin 5'-3' (lu à partir du centromère). Cette extension varie en longueur au cours du cycle cellulaire. En général, elle est d'une longueur de 12 à 14 nt mais elle allonge jusqu'à 30 nucléotides en fin de phase S. À noter que l'extension simple brin n'a pas la séquence fixe illustrée mais est généralement G-riche.

Parallèlement, les télomères chez l'humain sont très longs mais la longueur de l'extension simple brin ne varie pas durant le cycle cellulaire. En effet, les télomères ont une longueur allant de 5 kpb à 10 kpb pour les répétitions T₂AG₃/C₃TA₂ double

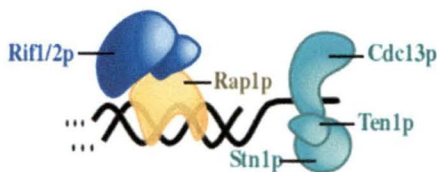
brin, tandis que le simple brin mesure de 50 à 150b (Makarov et al., 1997 ; McElligott et Wellinger, 1997; Wright et al., 1997).

Fonctions des télomères

Les télomères exercent plusieurs fonctions au niveau de la cellule. Premièrement, les télomères exercent un certain contrôle sur l'expression génique. Le phénomène du « *telomere position effect* » (TPE) décrit initialement par les groupes de Gottschling et Zakian suggère que, chez certains organismes, les télomères possèdent une structure chromatinienne différente de celle retrouvée dans le reste de l'ADN (Gottschling *et al.*, 1990). Cette structure particulière, appelée télosome, empêcherait la transcription de gènes situés à proximité des télomères. Le télosome (ADN télomérique + protéines liées) agit donc comme un nucléosome à l'extrémité des chromosomes via la liaison de protéines comme Rap1p, chez la levure, aux séquences télomériques (Conrad et al., 1990; Wright et Zakian, 1995), fermant ainsi la chromatine et réduisant l'expression des gènes situés près des télomères.

Deuxièmement, les télomères assurent l'intégrité des chromosomes en permettant que leurs extrémités ne soient pas reconnues par la machinerie de réparation de l'ADN comme étant des cassures double brin. La structure nucléoprotéique au bout des chromosomes permet donc de former un capuchon télomérique qui protège contre la dégradation par des exonucléases, la recombinaison ainsi que des fusions bout-à-bout (Blasco et al., 1997; McClintock, 1939; McClintock,

1941; Sandell et Zakian, 1993; van Steensel et al., 1998; Zakian, 1995). Afin de former le capuchon télomérique, plusieurs protéines se lient à l'ADN télomérique. Parmi ces protéines, chez la levure, la protéine Cdc13p assure un rôle essentiel dans la protection du télomère via sa liaison au simple brin télomérique. De plus, sa présence régule l'accès à l'extension 3' simple brin (Bourns et al., 1998; Lin et Zakian, 1996). Il a été démontré que la perte du gène *CDC13* entraîne un raccourcissement de brin C-riche causant ainsi un arrêt du cycle cellulaire (Garvik *et al.*, 1995). Cdc13p est donc un élément majeur liant le simple brin télomérique, protégeant ainsi l'extension simple brin et tout le chromosome contre la dégradation. D'autres fonctions de Cdc13p seront énoncées plus loin. D'autres protéines présentes dans le capuchon télomérique de la levure sont Rap1p (Conrad *et al.*, 1990), Rif1/2p (Hardy *et al.*, 1992), Stn1p et Ten1p (Grandin *et al.*, 2001; Grandin *et al.*, 1997). Ces protéines sont toutes, de près ou de loin, reliées à la régulation de l'activité de la télomérase, de l'accès aux séquences télomériques et au maintien du capuchon télomérique. La structure générale de ce capuchon est illustrée à la figure 3.



Tiré de Hug, N. & Lingner, J. Chromosoma. 2006

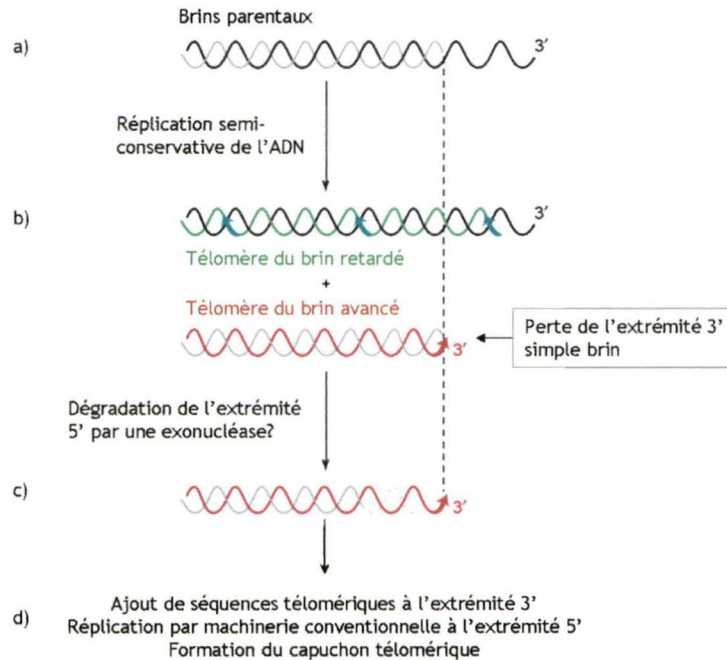
Figure 3 : Structure nucléoprotéique du capuchon télomérique de *Saccharomyces cerevisiae*.

Rap1p lie la partie double brin du télomère et agit comme régulateur négatif de la télomérase via le recrutement de Rif1/2p. Cdc13p lie la partie simple brin G-riche et assure la protection en recrutant Stn1p et Ten1p qui, ensemble, préviennent la dégradation des télomères. Cdc13p interagit également avec Est1p, une sous-unité de la télomérase, afin de recruter l'enzyme aux télomères.

Finalement, les organismes eucaryotes possèdent un génome à organisation linéaire. Puisque les ADN polymérases conventionnelles ne peuvent répliquer

complètement les molécules d'ADN à bouts francs (Watson, 1972) et les chromosomes ayant des extensions 3' terminales (Lingner *et al.*, 1995), la réplication des extrémités des chromosomes linéaires nécessite une machinerie spéciale (figure 4a). Le passage d'une fourche de réplication à la fin du chromosome génère deux molécules d'ADN sœurs différentes : le brin avancé et le brin retardé. La synthèse du brin retardé se fait de façon discontinue à l'aide de courtes amorces d'ARN et la dégradation de la dernière amorce à la fin du chromosome générera une extension 3' simple brin (Olovnikov, 1971; Olovnikov, 1973). La synthèse du brin avancé se fait de façon continue dans la direction 5'→ 3' à l'aide du brin parental dont l'extrémité est C-riche (figure 4b). Étant donné que le brin avancé est en retrait par rapport au brin parental, le brin avancé nouvellement synthétisé se verra raccourcit de quelques nucléotides, soit de 8 à 12 bases chez la levure et 50 à 150 bases chez certains mammifères (Blasco *et al.*, 1997; Harley *et al.*, 1990; Lundblad et Szostak, 1989). De plus, le modèle de réplication semi-conservative prédit que le télomère du brin avancé se terminera par un bout franc (figure 4c). Hors, des études ont démontré la présence d'extensions 3' simple brin à chaque bout des chromosomes. Il a été démontré qu'une exonucléase vient dégrader le brin C-riche en 5' pour ainsi générer des extensions simple brin des deux côtés des chromosomes (Makarov *et al.*, 1997; Wellinger *et al.*, 1996). La génération de ces extensions permet la liaison d'une enzyme capable d'ajouter des séquences télomériques, la télomérase, au bout des chromosomes (Greider et Blackburn, 1987). Ce faisant, la télomérase aide à la réplication complète du chromosome sans perte de séquences télomériques. Les télomères jouent donc un

rôle important au niveau de la réplication complète des chromosomes en permettant l'action de la télomérase (figure 4d).



Tiré de Kelleher et al. TIBS 2002

Figure 4 : La réplication semi-conservative de l'ADN engendre une asymétrie aux télomères.

Voir dans le texte pour une description détaillée du schéma. a) brins parentaux avant le passage de la fourche de réplication, le brin G-riche possède une extension 3' simple brin alors que le brin C-riche est en retrait par rapport au brin opposé. b) Le passage de la fourche de réplication crée deux extrémités différentes : le télomère du brin avancé (rouge) et le télomère du brin retardé (vert). Les amorces ARN du brin retardé sont représentées par des flèches plus grasses. c) le brin avancé se terminant par une extrémité franche, il y aura dégradation de l'extrémité C-riche par une exonucléase. d) après l'action de l'exonucléase, chaque extrémité des chromosomes possède une extension 3' simple brin qui servira de substrat à la télomérase et la réplication se terminera en reformant le capuchon télomérique.

LA TÉLOMÉRASE

Enzyme découverte par Elizabeth H. Blackburn en 1985, la télomérase a été caractérisée pour la première fois chez le cilié *Tetrahymena thermophila* (Greider et Blackburn, 1985). Par la suite, plusieurs études ont mené à la découverte de l'enzyme chez d'autres organismes tels que l'humain et la levure (Cohn et Blackburn, 1995;

Morin, 1989). L'idée que l'ADN n'était pas seulement répliqué par la machinerie de réplication conventionnelle semi-conservative a mené Blackburn et Greider à la recherche d'une activité pouvant ajouter de l'ADN télomérique à un oligonucléotide G-riche en absence d'une matrice d'ADN. Tout d'abord perçue comme une transférase déoxyterminale, elles ont alors découvert que la télomérase est une ribonucléoprotéine (formée de protéines et d'une matrice d'ARN) qui dicte de façon intrinsèque l'ajout des séquences télomériques lors de l'élongation du brin G-riche. La télomérase est une transcriptase inverse qui, grâce à la séquence complémentaire retrouvée dans sa portion ARN, est capable d'allonger l'extrémité 3' des chromosomes (Blackburn *et al.*, 1989; Yu *et al.*, 1990). Hautement conservée chez les organismes eucaryotes, la télomérase est inactive dans la plupart des cellules somatiques chez l'humain. Par contre, son activité peut être décelée de façon constitutive dans les cellules germinales, certaines cellules cancéreuses et chez les organismes unicellulaires (Cohn et Blackburn, 1995; Counter *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1994). La télomérase joue donc un rôle important au niveau du maintien de la stabilité génomique en empêchant le raccourcissement des chromosomes après chaque ronde de réplication, ce qui pourrait mener à la mort cellulaire due à des télomères trop courts et incapables d'assurer la formation du capuchon télomérique (de Lange *et al.*, 1990; Harley *et al.*, 1990; Hastie *et al.*, 1990).

Composantes de la télomérase

Plusieurs protéines sont impliquées dans la formation de l'holoenzyme de la télomérase (figure 5). Ces protéines sont essentielles pour le maintien des télomères *in vivo* (Lendvay *et al.*, 1996). La télomérase est également composée d'un ARN non-codant qui est également essentiel à l'activité de transcriptase inverse puisqu'il agit à titre de matrice pour la synthèse des extensions G-riches et sert d'échafaudage pour l'assemblage de l'holoenzyme (Singer et Gottschling, 1994; Theimer et Feigon, 2006). La télomérase chez la levure a longtemps posé des problèmes au niveau de sa composition protéique puisque les essais *in vitro* standards d'extension d'amorce spécifiques à l'activité de télomérase ne fonctionnaient pas dans des extraits cellulaires de levure (Cohn et Blackburn, 1995) alors qu'ils fonctionnaient chez les ciliés, protozoaires et les vertébrés (Morin, 1989; Shippen-Lentz et Blackburn, 1989; Zahler et Prescott, 1988). Un criblage génétique a alors été effectué dans le but de déterminer les éléments nécessaires à la télomérase de la levure. Cinq gènes essentiels à l'activité de télomérase *in vivo* ont été découverts. Ces gènes sont *EST1*, *EST2*, *EST3*, *TLC1* et *CDC13* (ou *EST4*) (Lendvay *et al.*, 1996; Lundblad et Szostak, 1989; Singer et Gottschling, 1994). Une défectuosité dans un de ces gènes mène à un phénotype *EST*, c'est-à-dire « *ever shorter telomeres* ». Ce phénotype se traduit par un raccourcissement graduel des télomères de 8 à 12 bases par génération ainsi qu'à une diminution de la viabilité après 50 à 100 générations, moment où les télomères ont atteint une longueur critique favorisant la perte de chromosomes via différents

processus (Hackett et al., 2001; Lundblad et Szostak, 1989; Singer et Gottschling, 1994).

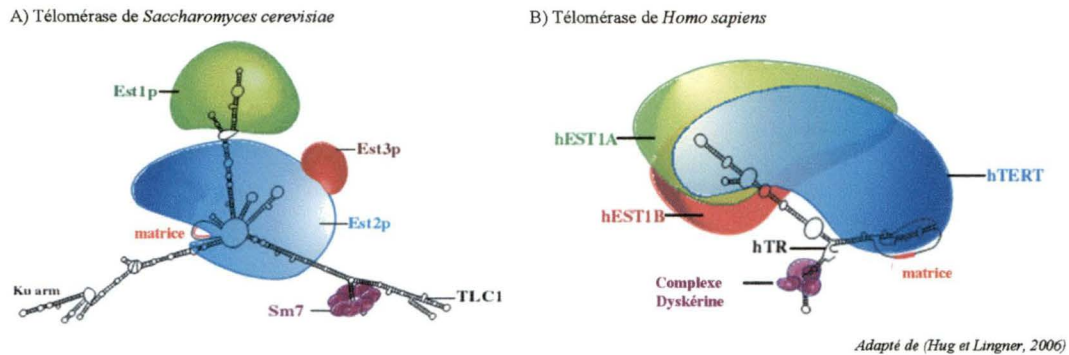


Figure 5 : Complexe enzymatique de la télomérase chez *Saccharomyces cerevisiae* (A) et *Homo sapiens* (B). Voir dans le texte pour la description des différentes sous-unités de la télomérase.

La sous-unité catalytique

In vitro, le cœur catalytique de la télomérase ainsi que la composante ARN sont les seuls éléments requis pour recréer de l'activité enzymatique spécifique à la télomérase (Cohn et Blackburn, 1995; Counter et al., 1997). La sous-unité catalytique de la télomérase chez la levure se nomme Est2p (103 kDa) et est l'homologue fonctionnel de la protéine p123 (123 kDa) chez les *Euplotes* (Lingner et al., 1997b) et hTERT chez l'humain (Kilian et al., 1997; Meyerson et al., 1997; Nakamura et al., 1997). L'étude de la famille des télomérases de différents organismes a mené à la détermination d'une structure secondaire hautement conservée de la protéine (Harrington, 2003). Cette organisation peut se subdiviser en 4 domaines majeurs impliqués dans les diverses fonctions de la télomérase (figure 6).

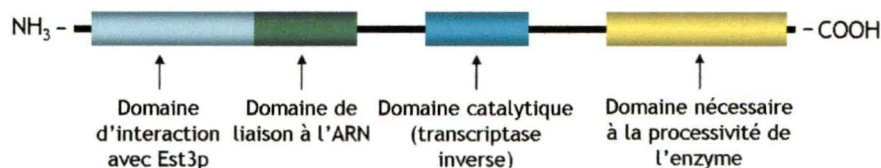


Figure 6 : Domaines fonctionnels de la protéine Est2p, la sous-unité catalytique de la télomérase chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

La sous-unité catalytique de la télomérase chez les ciliés et l'humain possède des domaines semblables.

Plus en détails, le domaine N-terminal d'Est2p est divisé en deux parties. La première est nécessaire à l'interaction avec la protéine Est3p et est située à l'extrémité (Friedman *et al.*, 2003). La deuxième partie est le domaine de liaison à l'ARN TLC1 (Friedman et Cech, 1999). Le cœur de la protéine se situe dans le domaine central, soit le domaine catalytique de l'enzyme. Ce domaine renferme les motifs conservés entre la télomérase et les transcriptases inverses (O'Reilly *et al.*, 1999). Finalement, le domaine C-terminal est nécessaire pour assurer la processivité de l'enzyme. Chez la levure, le domaine C-terminal peut être enlevé sans affecter l'activité *in vivo* mais il est essentiel chez l'humain et les ciliés (Banik *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 2001).

Les facteurs accessoires

En plus de la sous-unité catalytique présentée à la figure 6, plusieurs protéines essentielles à l'activité *in vivo* de la télomérase sont associées avec l'holoenzyme (Lendvay *et al.*, 1996). Ces protéines ne sont toutefois pas requises pour l'activité *in vitro* (Lingner *et al.*, 1997a). Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, ces protéines sont Est1p, Est3p et Cdc13p. Il existe des analogues fonctionnels d'Est1p et de Cdc13p chez l'humain, mais il n'en existe aucun pour Est3p pour l'instant.

Est1p est une protéine associée à la télomérase via son interaction avec une structure secondaire présente dans l'ARN TLC1 (Seto *et al.*, 2002) et peut se lier légèrement à l'ADN simple brin télomérique (Virta-Pearlman *et al.*, 1996). Le rôle précis d'Est1p dans le maintien des télomères est encore controversé. Plusieurs expériences faites à l'aide de protéines de fusion ont démontré qu'Est1p recrute la télomérase à la fin des chromosomes via son interaction avec la protéine Cdc13p. Une fusion entre Cdc13p et Est2p permet l'élongation des télomères même en absence de la protéine Est1p, suggérant que Est1p est requise pour l'interaction entre l'enzyme et le télomère (Evans et Lundblad, 1999). D'un autre côté, le groupe de Virginia Zakian a suggéré qu'Est1p agirait à titre d'activateur de la télomérase de façon cycle cellulaire dépendante. À l'aide d'immunoprécipitations de la chromatine (ChIP), ils ont démontré qu'Est2p est liée aux télomères via Cdc13p durant tout le cycle cellulaire (alors qu'en principe, l'élongation des télomères se fait en fin de phase S (Marcand *et al.*, 2000)) et qu'Est1p ne serait présente qu'en fin de phase S. Cette liaison d'Est1p en fin de phase S pourrait entraîner un changement de conformation de l'enzyme ou une multimérisation permettant son activation (Taggart *et al.*, 2002). Chez l'humain, il existe trois homologues de la protéine Est1p. Deux d'entre eux, hEST1A et hEST1B sont associés à l'activité de télomérase (Snow *et al.*, 2003). hEST1A lie les télomères sans la nécessité de l'ARN hTER et, lorsque surexprimé, la longueur des télomères raccourcit due à une déprotection des télomères, provoquant des fusions chromosomiques (Reichenbach *et al.*, 2003). L'homologue hEST1B aurait, pour sa part, un rôle similaire à Est1p sans toutefois avoir la capacité de lier l'ADN simple brin.

La sous-unité Est3p suscite encore beaucoup d'intérêt puisque sa fonction au sein de l'holoenzyme est toujours ambiguë et aucun homologue fonctionnel n'a été trouvé à ce jour. Des essais utilisant des versions étiquetées des différentes composantes de la télomérase ont démontré qu'Est3p faisait partie du complexe enzymatique actif et que cette interaction est dépendante de la présence d'Est2p (Hughes *et al.*, 2000). Récemment, il a été suggéré qu'Est3p pouvait lier des hétéroduplex ARN/ADN et qu'elle posséderait une activité de déenroulement sur ceux-ci (Sharanov *et al.*, 2006). Cette fonction pourrait donc servir à défaire l'interaction entre la matrice ARN de TLC1 et l'extension télomérique simple brin lors de l'élongation par la télomérase, permettant ainsi un recyclage de l'enzyme ou tout simplement pour terminer le cycle d'élongation. Un autre groupe a également suggéré qu'Est3p peut dimériser *in vitro* et que cette dimérisation aide à l'élongation des télomères lors de la réplication *in vivo* (Yang *et al.*, 2006).

Bien que les fonctions proposées pour Est3p sont appuyées par les différentes études effectuées, la fonction hélicase proposée par Sharanov et al. pourrait être redondante avec celle de la protéine Pif1p chez la levure. Cette hélicase possède plusieurs fonctions au sein de la levure dont celle de déenrouler préférentiellement des hybrides ADN-ARN. De cette façon, l'hélicase Pif1p inhibe la télomérase chez *Saccharomyces cerevisiae* en entraînant une dissociation entre TLC1, l'ARN de la télomérase, et l'extrémité simple brin du chromosome (Boule *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2000).

Finalement, la protéine Cdc13p fait également partie du complexe de la télomérase chez la levure (hPot1p chez l'humain). Cdc13p est l'une des principales protéines impliquées dans la formation du capuchon protecteur télomérique en liant l'extension 3' simple brin, la protégeant ainsi contre la dégradation (Garvik *et al.*, 1995). De plus, Cdc13p joue un rôle au niveau de la télomérase qui consiste à recruter l'holoenzyme aux télomères via une interaction avec Est1p et permettre l'accès et l'élongation de l'extension 3' simple brin (Evans et Lundblad, 2002; Nugent *et al.*, 1996). En effet, deux allèles de *CDC13*, *cdc13-1^{ts}* et *cdc13-2*, ont été analysées et ont aidé à la séparation des fonctions de la protéine Cdc13p. L'allèle *cdc13-1^{ts}*, à température restrictive, ne permet pas la survie cellulaire dû à la perte du brin C-riche démontrant ainsi sa fonction de protection des télomères (Garvik *et al.*, 1995). Par ailleurs, l'allèle *cdc13-2* ne permet pas le recrutement de la télomérase aux télomères créant ainsi des cellules viables mais avec un phénotype *est*. Par contre, la protéine Cdc13-2p lie toujours les télomères *in vivo* et n'empêche pas l'activité de la télomérase *in vitro* (Taggart *et al.*, 2002).

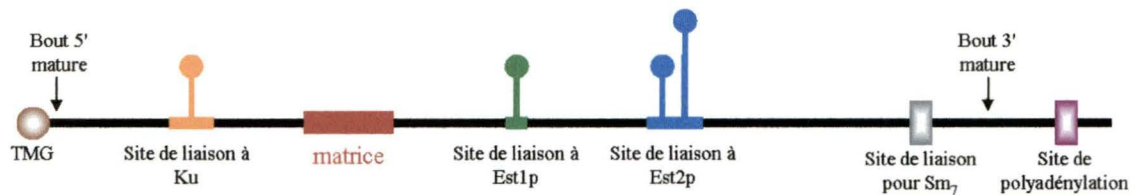
L'ARN de la télomérase

La composante ARN de la télomérase des levures aux vertébrés est essentielle au maintien des télomères. Elle possède deux importantes fonctions : elle assure l'ajout de séquences télomériques par le biais de sa matrice (Greider et Blackburn, 1989; Singer et Gottschling, 1994) et elle sert d'échafaudage dans l'assemblage de l'holoenzyme en permettant la liaison de la sous-unité catalytique ainsi que les autres

protéines accessoires (Zappulla et Cech, 2004). Chez la levure, la délétion du gène cause, tout comme les *EST*, un raccourcissement progressif des télomères et de la sénescence après 50 à 80 générations (Singer et Gottschling, 1994). Chez l'humain, une mutation dans le gène codant pour l'ARN peut engendrer des maladies génétiques telles que la dyskératose congénitale et l'anémie aplastique (Chen et Greider, 2004; Ly et al., 2005).

L'ARN de la télomérase a été initialement identifié chez le cilié *Tetrahymena thermophila* (Greider et Blackburn, 1989). Par la suite, il a été identifié chez la levure (Singer et Gottschling, 1994) et chez les mammifères tels que la souris (Blasco *et al.*, 1995) et l'humain (Feng *et al.*, 1995). Bien que très conservé au niveau de ses fonctions, l'ARN de la télomérase varie en taille et en séquence parmi les différents organismes. L'ARN est beaucoup plus long chez la levure (1.3 kb) comparativement aux ciliés (160-200 bases) ou l'humain (450 bases) (Feng et al., 1995; Singer et Gottschling, 1994). Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, le gène codant pour l'ARN de la télomérase se nomme *TLC1* et est transcrit par l'ARN polymérase II. Une fois transcrit, l'ARN est mûré et subit différentes modifications qui le rend très similaire aux petits ARNs nucléaires (snRNAs). *TLC1* subira l'ajout en 5' d'un capuchon TMG (triméthylguanosine) ainsi que d'une queue poly-A en 3'. Finalement, un heptamère de protéines Sm vient se lier à l'extrémité 3' de l'ARN. Les protéines Sm sont importantes pour l'accumulation de *TLC1* dans la cellule (Chapon *et al.*, 1997; Seto *et al.*, 1999). Par contre, seulement 5-10% des molécules de *TLC1* seront polyadénylées puisque la queue poly A disparaît rapidement au cours de sa maturation

moléculaire. Toutes ces caractéristiques rendent TLC1 très similaire au snRNA U1 et pourrait peut-être donner des indices sur le mode de régulation de la télomérase. Cet aspect sera discuté plus loin.



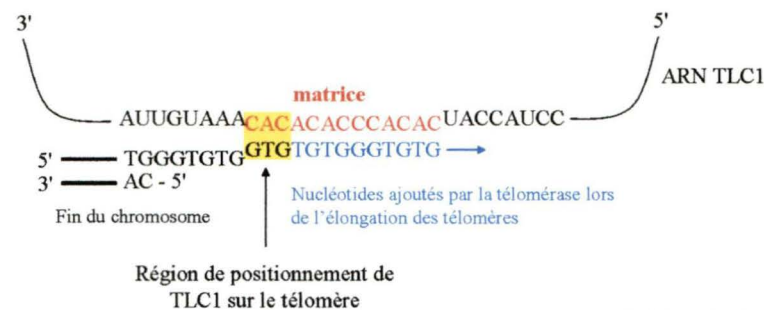
Modifié de Mazdy & Cech 2006

Figure 7 : Diagramme représentant les principales caractéristiques de TLC1.

L'ARN TLC1, 1300 nucléotides, possède plusieurs caractéristiques essentielles à la télomérase. L'ARN est mûré en 5' et en 3' et est lié par un heptamère de protéines Sm. Les protéines de l'holoenzyme ont chacune un site de liaison à l'ARN. La matrice, 5' - CACACACCCACACCAC - 3' (en rouge) chez la levure, dicte l'ajout de séquences télomériques aux extrémités simple brin des chromosomes.

Dans le but de mieux comprendre le fonctionnement de la télomérase, différents groupes ont ciblé leurs efforts sur la caractérisation de la structure de l'ARN de la télomérase puisqu'elle joue un rôle majeur au sein de l'holoenzyme. Ces études ont d'abord démontré que l'ARN de la télomérase possède une séquence simple brin qui sert de matrice à l'ajout des séquences télomériques. Cette matrice aide à positionner l'ARN au bout du chromosome et la télomérase ajoute les nucléotides complémentaires à ceux présents dans la matrice (Feng et al., 1995; Greider et Blackburn, 1989; Shippen-Lentz et Blackburn, 1990). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la séquence de la matrice est 5' - CACACACCCACACCAC - 3' (Singer et Gottschling, 1994). Contrairement aux télomères des mammifères et la plupart des ciliés, les répétitions télomériques chez la levure sont très hétérogènes et ne possèdent pas une séquence répétée précise (Kim *et al.*, 1994; Kirk *et al.*, 1997). Les différentes possibilités de positionnement de l'ARN sur l'ADN simple brin télomérique ainsi que

l'arrêt prématuré de la transcription inverse pendant l'élongation sont deux causes de l'hétérogénéité de séquences observée aux télomères de la levure (Forstemann et Lingner, 2001).



Tiré de Singer & Gottschling, Science 1994

Figure 8 : Modèle de positionnement de la matrice de TLC1 sur l'extension 5' du télomère.

La matrice de l'ARN TLC1 (rouge) aide au positionnement de l'holoenzyme sur le télomère en s'hybridant à la séquence complémentaire présente sur l'extension 3' simple brin (carré jaune). Suite à ce positionnement, la télomérase peut ajouter des nucléotides complémentaires à sa matrice (bleu).

Une caractéristique commune à plusieurs ARNs non-codants est leur structure secondaire qui, généralement, est très importante pour la fonction de l'ARN au sein de la cellule. La structure secondaire de l'ARN de la télomérase n'est pas une exception. Plusieurs études ont démontré que la composante ARN de la télomérase possédait une importante structure secondaire essentielle pour rassembler toutes les protéines impliquées dans le maintien des télomères *in vivo* et ce pour la plupart des organismes étudiés (Chen et al., 2000; Licht et Collins, 1999; Theimer et al., 2005; Zappulla et Cech, 2004), (Dandjinou et al., 2004; Theimer et Feigon, 2006). L'ARN de la télomérase des ciliés et des vertébrés étant de petite taille, la structure secondaire a pu être identifiée assez facilement. Par contre, la très grande taille de TLC1 ainsi que la faible disponibilité de séquences de *Saccharomyces spp* ont rendu l'identification de la structure secondaire très difficile. Ce n'est que tout récemment que la première

structure secondaire pour TLC1 a été proposée suite à des analyses phylogénétiques comparatives et des essais enzymatiques par quelques groupes (Dandjinou et al., 2004; Forstemann et Lingner, 2005; Zappulla et Cech, 2004). La structure secondaire telle que proposée par Dandjinou *et al.* est illustrée à la figure 9.

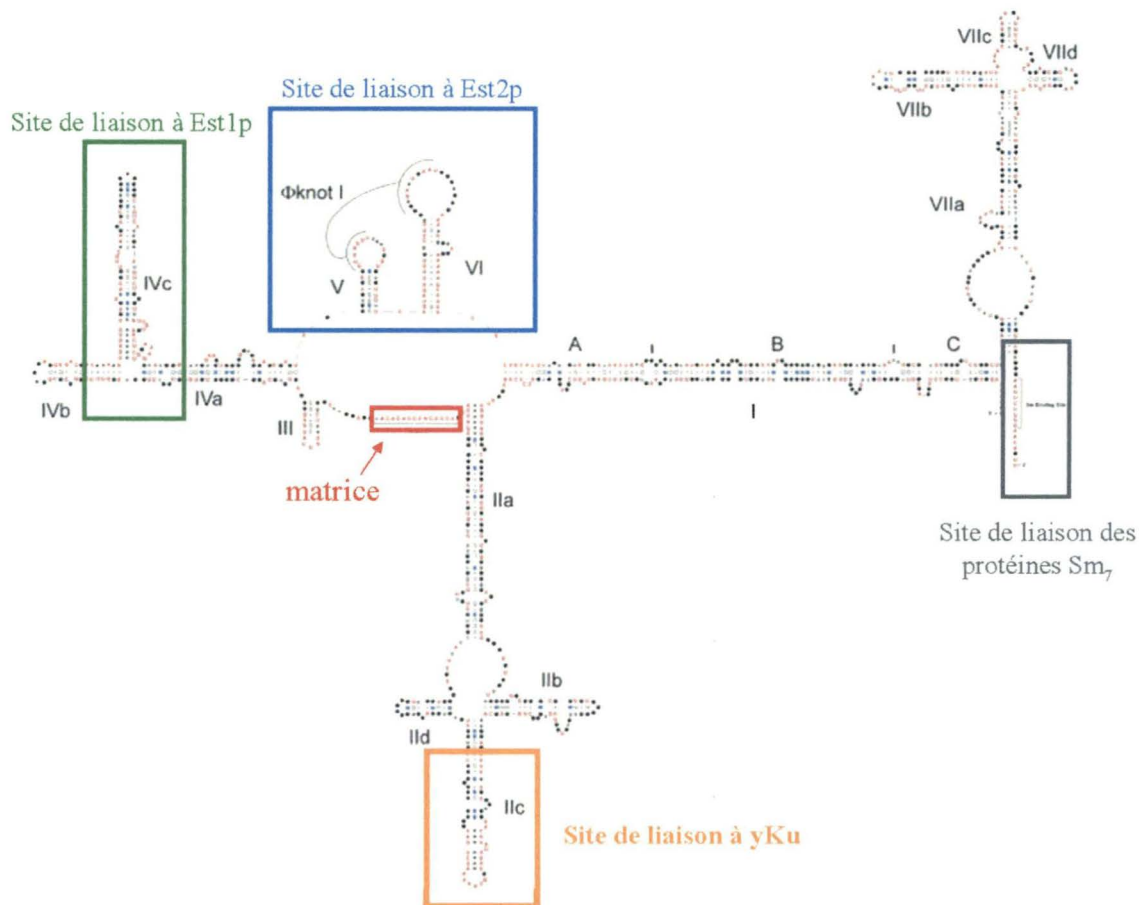


Figure 9 : Structure secondaire de l'ARN TLC1 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

La structure possède 7 hélices majeures qui sont numérotées de I à VII. Ces hélices subdivisent l'ARN en domaines qui jouent différentes fonctions. Les sites de liaison aux différentes protéines de la télomérase ainsi que des protéines accessoires sont encadrés. Est2p lie une combinaison de deux hélices, V et VI, possiblement via la formation d'un pseudonœud (bleu). Est1p lie la portion c de l'hélice IV (vert) et l'hétérodimère yKu lie la tige-boucle IIc (orange). L'heptamère de protéines Sm lie la portion 3' de l'ARN (gris). La matrice de l'ARN est encadrée en rouge.

De façon détaillée, la structure secondaire de TLC1 peut être subdivisée en plusieurs domaines importants. Certains de ces domaines ont été caractérisés avant

même que la structure secondaire ne soit élucidée. La matrice de l'ARN a été déterminée, tel que mentionné précédemment, par le groupe de Daniel E. Gottschling (Singer et Gottschling, 1994). Cette région est bien évidemment simple brin et spécifie la séquence de l'ADN télomérique. La matrice est suivie d'une limite matricielle, bien conservée parmi les levures à bourgeon, qui dicte l'arrêt de la transcription inverse lors de l'élongation par la télomérase (Seto *et al.*, 2003; Tzfati *et al.*, 2000). Cet arrêt est spécifié par un élément pairé (tige) immédiatement en 5' de la matrice de l'ARN.

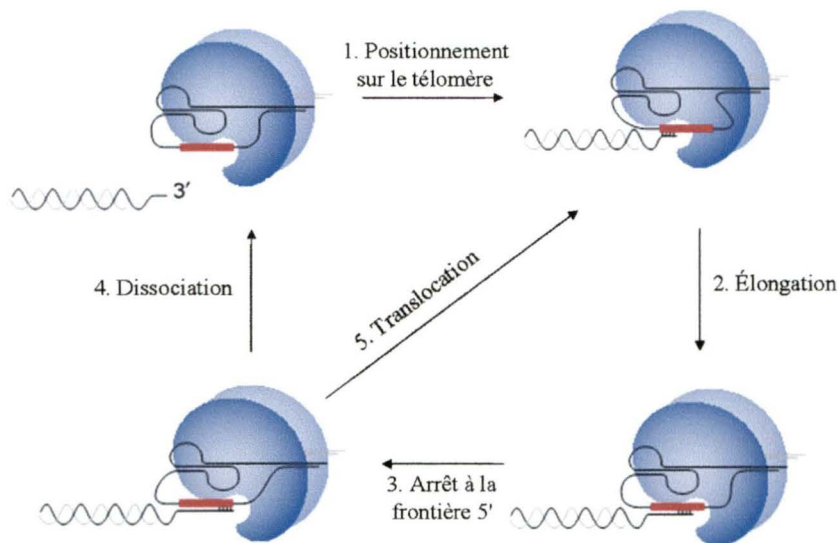
Probablement l'élément le plus important de l'ARN TLC1 est le site de liaison à la sous-unité catalytique Est2p. Cette région est formée des hélices V et VI et comprend également la matrice. Cette partie centrale et essentielle permet la liaison à Est2p et l'activité de transcription inverse (Chappell et Lundblad, 2004; Livengood *et al.*, 2002; Seto *et al.*, 2002). Chez les ciliés et les vertébrés, la formation d'un pseudonoeud dans la région centrale a été démontrée et serait essentielle à l'activité de télomérase (Theimer *et al.*, 2005), (Chen et Greider, 2005; Gilley et Blackburn, 1999). D'un autre côté, des analyses phylogénétiques effectuées chez *Kluyveromyces lactis* ont démontré également la formation d'un pseudonoeud et celui-ci serait nécessaire à l'activité de l'enzyme (Tzfati *et al.*, 2003). Il est donc possible d'émettre l'hypothèse qu'une telle structure serait également formée chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Une étudiante dans le laboratoire de Raymund Wellinger travaille à l'identification de la structure du pseudonoeud possible dans cet organisme.

Tout près du site central, la tige-boucle IVc permet la liaison à la protéine Est1p (Livengood *et al.*, 2002; Seto *et al.*, 2002). L'hétérodimère yKu, impliqué dans la réparation des cassures double brin par NHEJ et dans le recrutement aux télomères de l'holoenzyme, lie une structure en épingle de 48 nucléotides située dans l'hélice IIc (Peterson *et al.*, 2001; Stellwagen *et al.*, 2003). Finalement, les extrémités 5' et 3' de l'ARN seraient davantage impliquées dans la maturation, la localisation et la stabilité de l'ARN TLC1 via l'ajout du capuchon triméthylguanosine et des protéines Sm (voir description aux pages précédentes).

Des données publiées par le groupe de Thomas R. Cech ont démontré que, malgré la grande taille de l'ARN de la télomérase chez la levure par rapport aux autres organismes, plusieurs éléments de l'ARN peuvent être enlevés, formant ainsi un « Mini-TLC1 ». Tout en conservant l'activité de télomérase *in vitro*, les cellules arborant la version « mini » de TLC1 ne sénesce pas mais la longueur des télomères est plus courte (Zappulla *et al.*, 2005). L'ARN TLC1 étant impliqué dans plusieurs processus de régulation de la télomérase, par exemples la processivité et la localisation, la caractérisation de sa structure secondaire est un pas de plus vers la compréhension des mécanismes biologiques entourant la télomérase chez *Saccharomyces cerevisiae*. Il a également été proposé que l'enzyme agisse sous forme de dimère via l'interaction entre deux molécules d'ARN TLC1 (Prescott et Blackburn, 1997). Grâce à la détermination de la structure secondaire de TLC1, il sera maintenant possible de répondre à ces questions par des analyses détaillées génétiques, biochimiques et moléculaires.

Mécanismes d'action de la télomérase

Le processus d'extension des télomères par la télomérase a été étudié surtout à l'aide de l'essai d'activité *in vitro*. Pendant une ronde d'élongation processive par la télomérase, la petite région matrice dans l'ARN est utilisée continuellement pour synthétiser l'ADN G-riche. Le mécanisme d'action de la télomérase possède plusieurs étapes qui sont illustrées à la figure 10. La première étape consiste au positionnement de l'enzyme sur l'extension télomérique simple brin. Cette interaction se fait à l'aide de l'ARN de la télomérase, dans la région matricielle. Ensuite, l'enzyme procède à l'élongation en ajoutant des nucléotides à l'extrémité 3' du chromosome. La matrice comprise dans l'ARN dicte cet ajout. Finalement, la télomérase se dissocie de son substrat et s'associe à nouveau pour une autre ronde d'élongation (translocation). La télomérase peut également demeurer dissociée pour ainsi terminer le cycle d'élongation. La dissociation est principalement dictée par une région frontière dans l'ARN, immédiatement en 5' de la matrice. Contrairement aux ciliés et les vertébrés, la télomérase de *Saccharomyces cerevisiae* n'est pas processive *in vitro* puisque l'association de l'enzyme à son substrat est très stable (Prescott et Blackburn, 1997),(Collins et Greider, 1993; Greider, 1991). *In vivo*, l'enzyme démontre une certaine processivité mais il semblerait qu'elle ait besoin de facteurs additionnels pour l'aider à se dissocier de son substrat (Forstemann *et al.*, 2003). Ces facteurs sont toujours inconnus et un des objectifs des travaux effectués pour ce mémoire est de purifier l'holoenzyme dans son état natif afin d'identifier de possibles partenaires impliqués dans la processivité de l'enzyme *in vivo*.



Adapté de Kelleher et al. TIBS 2006

Figure 10 : Cycle de réaction de la télomérase.

La télomérase se positionne sur l'extension télomérique simple brin via la matrice contenue dans l'ARN (1). L'extension des télomères se fait par la suite grâce à une réaction de transcription inverse et à la séquence dictée dans la matrice de l'ARN (2). L'enzyme allonge le télomère jusqu'à ce qu'elle atteigne la région frontière en 5' de la matrice (3). À ce moment, elle a le choix de se dissocier et arrêter l'élongation (4) ou de transloquer sur l'extension nouvellement synthétisé pour recommencer un autre cycle d'élongation (5).

Régulation de la télomérase

La régulation de l'activité de télomérase varie en fonction du type cellulaire chez l'humain. Tel que mentionné auparavant, la télomérase est activée chez les cellules germinales et cancéreuses, tandis qu'elle est inactivée dans les cellules somatiques. Cette régulation est importante dans la détermination de la limite proliférative des cellules. Dans la plupart de ces cas, la régulation se fait au niveau de la transcription de l'ARN messager de *hTERT* (Cong et al., 1999). Dans les cellules où la télomérase est exprimée et dans d'autres organismes tel que la levure *Saccharomyces cerevisiae*, il existe plusieurs niveaux de régulations de l'enzyme.

Tout d'abord, la structure protéique présente aux télomères régule l'accès de la télomérase aux télomères. Chez l'humain, les protéines double-brin spécifiques TRF1 et TRF2 forment, avec d'autres protéines, une structure nommée T-loop (Griffith *et al.*, 1999). Cette structure est formée par l'invasion de l'extension simple brin télomérique dans la partie double brin pour former une forme de boucle au bout du chromosome, limitant ainsi l'accès aux télomères par la télomérase (Collins, 2000; Vega *et al.*, 2003). Parallèlement, chez la levure, la protéine Rap1p ferme l'accès à l'extrémité du chromosome en se liant aux protéines Rif1/2p (Marcand *et al.*, 1999; Marcand *et al.*, 1997). D'autre part, il a déjà été question précédemment de la protéine Cdc13p chez la levure et hPot1 chez l'humain qui elles lient la portion simple brin et régulent le recrutement de la télomérase aux télomères (Colgin *et al.*, 2003; Nugent *et al.*, 1996). D'autres protéines telles que l'hétérodimère yKu, Stn1p, Ten1p, Pif1p ont des rôles dans la régulation de la télomérase (Grandin *et al.*, 2000; Grandin *et al.*, 2001; Grandin *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 2000). Récemment, le complexe RPA (replication protein A) a été identifié comme étant un nouveau régulateur de la télomérase (Schramke *et al.*, 2004). Par ailleurs, il a été démontré qu'un système de comptage des protéines liant les extrémités régulerait l'accès aux télomères. En effet, plus les télomères sont courts, moins de protéines inhibant la télomérase (Rif1p et Rif2p, par exemple) peuvent lier le télomère. Ainsi, la télomérase aurait une préférence pour l'élongation des télomères plus courts (Teixeira *et al.*, 2004).

Un autre processus de régulation de la télomérase humaine se fait au niveau de la localisation de l'enzyme par rapport aux télomères pendant le cycle cellulaire. En

effet, hTR et hTERT seraient séquestrés loin des télomères lorsque l'activité de la télomérase n'est pas requise (Jady *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2002).

Des niveaux de régulation reliés au cycle cellulaire existent également chez la levure. Le groupe de Virginia Zakian a démontré que la liaison d'Est1p au reste de la télomérase déjà liée au chromosome agirait à titre d'activateur de l'holoenzyme en fonction du cycle cellulaire (Taggart *et al.*, 2002). Tout récemment, le groupe de Katherine Friedman est venu à la conclusion, suite à des analyses de coimmunoprécipitation, que la protéine Est1p serait dégradée de façon protéasome-dépendante dans le cycle cellulaire. Cette variation dans la stabilité de la protéine régulerait ainsi l'assemblage de la télomérase aux télomères pendant la phase G1 afin que la télomérase soit prête à allonger les télomères en fin de phase S (Osterhage *et al.*, 2006).

Il existe sûrement d'autres mécanismes de régulation de la télomérase toujours inconnus. Mise à part la dégradation d'Est1p à l'aide du protéasome, très peu de mécanismes sont connus, à ce jour, qui régule l'expression de chacune des sous-unités de la télomérase. C'est pourquoi une étudiante dans les laboratoires de Shérif Abou Elela et Raymund J. Wellinger a lancé des travaux étudiant la possibilité que la ribonucléase III de la levure, la protéine Rnt1p, soit impliquée dans la régulation post-transcriptionnelle des niveaux d'expression des sous-unités de la télomérase.

Rnt1p est une endoribonucléase spécifique aux ARNs double brin. Elle est impliquée dans la maturation de plusieurs types d'ARNs tels les snARNs, snoARNs et les pré-ARNrs. (Abou Elela et Ares, 1998; Abou Elela et al., 1996; Chanfreau et al., 1997). De plus, Rnt1p serait impliquée dans la régulation de l'expression de certains ARNs messagers (Ge *et al.*, 2005). La très grande ressemblance de l'ARN de la télomérase avec les petits ARNs nucléaires (snARNs) ont mené à poser l'hypothèse que Rnt1p pourrait agir sur la télomérase via TLC1. Une délétion du gène *RNT1* a donc été effectuée et les ARNs messagers codants pour plusieurs composantes de la télomérase, dont TLC1, ont vu leur expression augmenter. Une analyse informatique visant la structure tige-tétraboucle reconnue et clivée par Rnt1p dans ses différentes cibles a été effectuée et a permis l'identification d'une structure reconnue par Rnt1p dans l'ARN messenger codant pour Est1p.

OBJECTIFS PRINCIPAUX

Un des objectifs de ce mémoire consiste à démontrer le rôle de régulateur négatif de la ribonucléase Rnt1p sur la télomérase en déterminant les niveaux de protéines des sous-unités de la télomérase, particulièrement Est2p ainsi qu'en effectuant des tests d'activité de télomérase *in vitro* dans un mutant *rnt1Δ*. Ces résultats seront présentés au chapitre 1 ainsi qu'à l'annexe 1.

Le manque de compréhension des mécanismes de régulation et la biochimie de l'holoenzyme chez la levure a mené à l'élaboration des différents projets présentés dans ce mémoire. En plus de l'implication de Rnt1p dans la régulation de la télomérase, la purification de l'holoenzyme dans son état natif semble être un aspect important pour mieux comprendre les mécanismes entourant la régulation de la télomérase. C'est pourquoi nous avons mené un projet de purification de la télomérase de la levure dans le but ultime d'étudier la biochimie de l'enzyme ainsi que de découvrir de nouveaux facteurs impliqués tant au niveau de l'activation, la processivité, la régulation de l'enzyme et plusieurs autres processus.

Finalement, étant donné l'importance d'étudier l'enzyme dans son état natif, nous avons entrepris de purifier les composantes de la télomérase dans le but de produire des anticorps contre les sous-unités de la télomérase puisque ceux-ci ne sont toujours pas disponibles et que les études sur les interactions entre les protéines de l'holoenzyme sont principalement faites à l'aide de protéines étiquetées.

Puisque la protéomique et l'étude des complexes protéiques ont acquis beaucoup d'importance au cours des dernières années, une bonne partie de ce mémoire portera sur l'étude de la télomérase au niveau des protéines qui la composent. Plus particulièrement, deux chapitres de cet ouvrage présenteront des techniques de purification de protéines : d'une part dans la levure et d'autre part en bactérie. Les différentes techniques de purification utilisées seront donc présentées

dans les prochaines pages afin de mieux situer les travaux qui ont été effectués aux chapitres 2 et 3.

PURIFICATION DE PROTÉINES

Depuis l'avènement du séquençage des génomes de différentes espèces, l'étude des protéines codées par ces gènes est devenue de plus en plus populaire au fil des années. Plusieurs groupes découvrent l'importance de mieux comprendre les propriétés biochimiques des protéines et des complexes qu'elles composent. C'est pourquoi plusieurs méthodes de purification ont été développées dans le but d'isoler, de caractériser et d'étudier différents complexes protéiques. Ces méthodes utilisent, pour la plupart, les propriétés intrinsèques des protéines à étudier telles que le point isoélectrique, la constante d'hydrophobicité et le poids moléculaire. D'autres méthodes plus populaires de nos jours consistent à utiliser des étiquettes peptidiques et/ou protéiques apposées aux protéines à étudier. Ces étiquettes permettent la purification de la protéine désirée autant dans un système endogène que dans un système de surexpression.

Purification de la télomérase

Au chapitre 2 de ce mémoire il sera exposé une tentative de purification de l'holoenzyme de la télomérase de la levure *Saccharomyces cerevisiae* dans son état natif en utilisant les propriétés isoélectriques de la sous-unité protéique Est2p. La purification de l'holoenzyme de la télomérase s'effectuera par l'utilisation de résine échangeuse d'ions qui profitera du fait que la protéine possède une charge électrique à un pH défini. La télomérase est un complexe protéique composé de plusieurs sous-unités et possédant une activité enzymatique *in vitro* et *in vivo*, facilitant ainsi l'analyse de chacune des étapes de purification. Plusieurs tentatives de purification ont déjà été faites autant chez l'humain que chez d'autres organismes tels que le protozoaire *Trypanosoma brucei*, le cilié *Tetrahymena thermophila* et la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Cano et al., 2002; Harrington et al., 1995; Liao et al., 2005; Munoz et Collins, 2004; Schnapp et al., 1998). Malgré ces différentes études, la composition exacte de l'holoenzyme de la télomérase reste toujours inconnue. C'est pourquoi plusieurs groupes travaillent sur cet aspect. Des systèmes de reconstitution *in vitro* existants ont surtout été utilisés pour étudier la télomérase humaine (Autexier et al., 1996; Bachand et Autexier, 1999; Beattie et al., 1998; Weinrich et al., 1997). Par contre, étant donné la très faible abondance de la télomérase chez la levure, ces systèmes s'avèrent quasi-inutilisables puisqu'il serait difficile d'obtenir une quantité raisonnable de protéine et d'activité (Mozdy et Cech, 2006) lorsqu'utilisés pour les protéines de la levure.

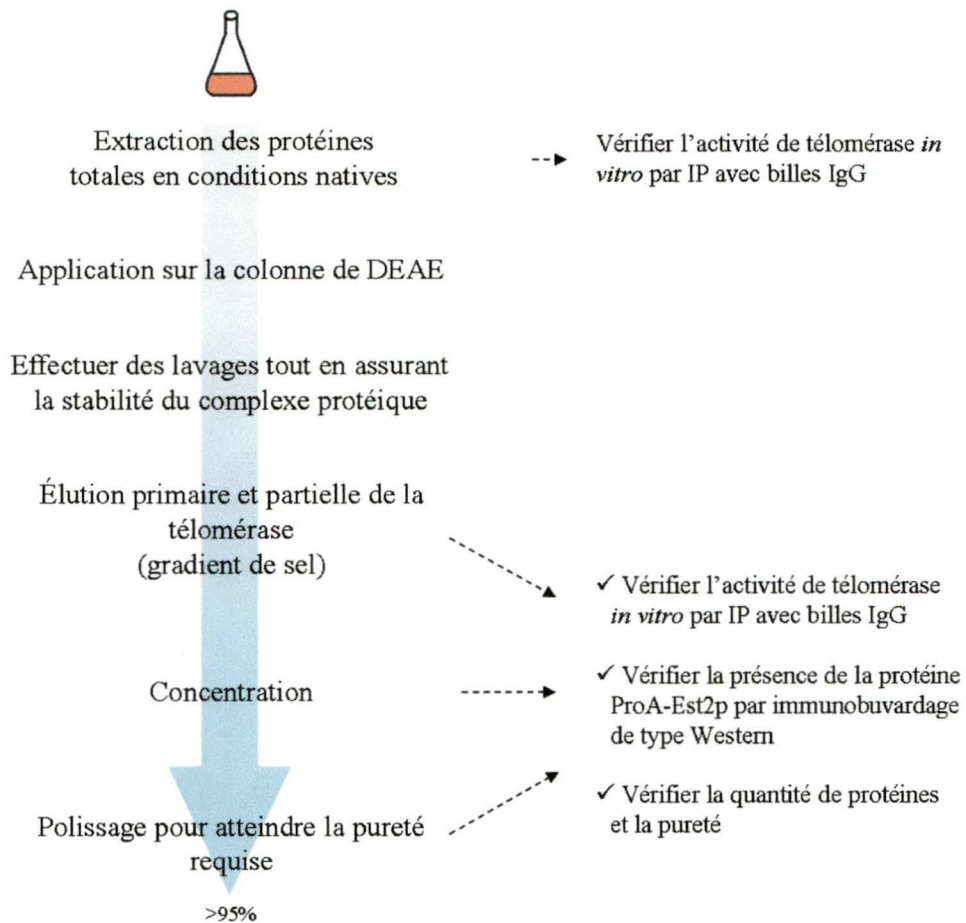
C'est pourquoi plusieurs études ont été réalisées et qui utilisent des systèmes de purification par affinité tel que l'utilisation des étiquettes ProA et c-myc ainsi que via la purification partielle de la télomérase (Cohn et Blackburn, 1995; Forstemann et Lingner, 2001; Friedman et Cech, 1999; Lue et al., 2003; Petrov et al., 2001; Teixeira et al., 2002). Une purification a même été tentée en surexprimant *TLC1* et une version étiquetée d'Est2p, GST-Est2p, mais les résultats n'ont pas été très convaincants (Liao *et al.*, 2005). La technique utilisée et publiée en 1995 par le groupe de Blackburn utilise la résine à échange d'ions DEAE afin de purifier partiellement la télomérase (Cohn et Blackburn, 1995). Avec cette technique, il est possible de détecter, dans l'éluat effectué avec 900 mM d'acétate de sodium, de l'activité *in vitro* de télomérase. Depuis, cette technique s'avère utile pour plusieurs groupes qui veulent étudier l'activité enzymatique *in vitro* de la télomérase. Par contre, peu de groupes se sont penchés sur la reconstitution et l'aspect biochimique de la télomérase chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Les composantes protéiques, les rapports stœchiométriques entre les protéines, la constante de dissociation et la constante catalytique de la télomérase sont tous des aspects encore inconnus. C'est pourquoi nous avons entrepris de purifier la télomérase dans son état natif via l'utilisation de la résine DEAE, dans le but d'identifier les composantes et d'obtenir différentes données biochimiques de l'holoenzyme.

Tel que précédemment cité, le groupe de Blackburn, en 1995, ont utilisé la DEAE. Ils ont en effet utilisé des versions « maison » de colonne ayant de la résine DEAE à l'intérieur. Nous avons donc entrepris de purifier la télomérase avec cette

résine mais à l'aide de l'appareil FPLC afin d'automatiser et de faciliter l'application de plus grandes quantités de protéines sur notre colonne de DEAE. Avant d'entreprendre le processus de purification, plusieurs paramètres devaient être déterminés afin de maximiser le rendement et la pureté de notre produit final, tout en minimisant le coût et le nombre d'étapes de purification requises pour y accéder. La stratégie ainsi que les caractéristiques de purification ont donc été établies et sont représentées à la figure 11. À noter qu'une version étiquetée d'Est2p (ProA-Est2p) a été utilisée pour faciliter le suivi de la purification et faire les essais d'activité *in vitro* à chaque étape de purification. La purification de la télomérase commence donc par l'extraction des protéines totales à l'aide d'une méthode qui ne dénature pas les protéines. À cette étape, il est important de déterminer la quantité initiale de cellules nécessaires. Nos essais ont été effectués à l'aide de 2 litres de culture. Suite à l'extraction, un test est effectué dans le but d'établir que l'extrait contient de la télomérase active. Ensuite, La colonne est lavée pour enlever le plus d'impuretés possible. Finalement, l'élution à une concentration de sel déterminée (dans ce cas 900 mM sel) est effectuée. Cette première élution résulte en une purification partielle de la télomérase telle qu'effectuée par les groupes cités auparavant. À cette étape, il est important de retrouver ProA-Est2p, l'ARN *TLC1* et de l'activité de télomérase *in vitro*. Si une de ces conditions n'est pas remplie, le processus doit être perfectionné soit en ajoutant une étape de concentration, de lavage ou de changement de tampon pour enlever les sels. La dernière étape consiste au polissage de notre fraction éluee. Cette étape consiste principalement à atteindre la pureté désirée, qui est de plus de 95% dans le cas où les protéines obtenues seront soumises à la spectrométrie de masse

ainsi qu'à des analyses biochimiques. Cette étape doit également se faire en utilisant une technique à haute résolution telle que la filtration sur gel afin de séparer les différents constituants et y retrouver ProA-Est2p. Les protéines obtenues à cette étape seront, en principe, celles qui nous intéresseront.

À chaque étape de purification il est important de contrôler la quantité de protéines obtenues et le coefficient de purification. Étant donné que la télomérase est en très faible quantité dans la cellule, cet aspect de la purification sera probablement le plus critique. L'objectif premier serait d'atteindre une purification d'au moins 100 fois afin de pouvoir détecter l'activité enzymatique sans immunoprécipitation préalable de la télomérase.



Pureté requise pour l'étude du complexe enzymatique (spectrométrie de masse, activité) = 95% pur

Coefficient de purification = 100X

Évaluation de la grosseur du complexe enzymatique minimal : ~310 kDa

Est1p = 82 kDa
Est2p = 103 kDa
Est3p = 20.4 kDa
Cdc13p = 104 kDa

Figure 11 : Stratégie et caractéristiques de purification de la télomérase sur colonne DEAE

Purification de protéines recombinantes en bactéries

L'étude de la télomérase en conditions natives nécessite la purification de toutes les composantes de l'holoenzyme afin de pouvoir étudier les interactions entre les protéines, les rapports stœchiométriques entre celles-ci ainsi que plusieurs autres données biochimiques qui aideraient à mieux comprendre le mode de fonctionnement et de régulation de la télomérase. Pour ce faire, les méthodes classiques de purification requièrent généralement l'utilisation d'anticorps spécifiques contre les différentes protéines du complexe. Ces anticorps permettent donc de suivre le cours d'une purification tout en s'assurant que les composantes de bases sont présentes (dans notre cas : Est1p, Est2p et Est3p) et qu'elles ne sont pas perdues à une étape ou une autre de la purification. À ce jour, aucun anticorps ciblant les différentes sous-unités de la télomérase n'est disponible, rendant l'étude du complexe très difficile. Le troisième chapitre de ce mémoire portera donc sur une tentative de purification d'une portion de la sous-unité Est1p dans le but de produire des anticorps contre la protéine. Il est donc important d'établir un bon système d'expression et de purification de la protéine afin d'obtenir un produit final pur et exempt de protéines non-spécifiques.

Plusieurs méthodes existent dans le but d'aider à la purification de protéines en assez grande quantité pour pouvoir produire des anticorps. En effet, la production d'anticorps nécessite au moins 1 mg de protéine pure à plus de 95%. Ces exigences strictes sont nécessaires à la bonne production d'anticorps dans l'animal choisi, dans notre cas le lapin, mais également afin d'assurer une production spécifique contre la

protéine désirée. Les méthodes les plus couramment utilisées se tournent vers l'utilisation de systèmes d'expression bactériens dans le but de surexprimer une protéine eucaryote choisie. Plus particulièrement, la production et la purification de protéines eucaryotes à l'aide de ces systèmes font souvent appel à l'utilisation d'étiquettes peptidiques et/ou protéiques dans le but de purifier la protéine recombinante par affinité, et ce en très grande quantité et spécificité. Le tableau 1 illustre les étiquettes les plus couramment utilisées avec leurs avantages et désavantages majeurs. À noter que l'emplacement de l'étiquette se fait autant en N-terminal qu'en C-terminal de la protéine, selon le besoin et la protéine à purifier.

Étiquette	Résine	Avantages	Désavantages
Hexahistidine (His ₆)	Ni-NTA (nickel)	<ul style="list-style-type: none"> • petite étiquette • systèmes d'expression variés • peu immunogénique • haut rendement • activité protéique conservée • facile à détecter (anti-His) • purification simple et rapide • stabilise les petits peptides ou petites protéines lors de l'expression • résine peu coûteuse • excellente pureté de purification 	<ul style="list-style-type: none"> • ne peut être enlevé sauf si site de clivage ajouté • conditions d'élution peuvent être difficiles • peut influencer les analyses protéiques subséquentes (ex: RMN, spectrométrie de masse) • petite étiquette donc peut être masquée par protéine de fusion et empêcher la liaison à la résine • ions métalliques de la résine peuvent se solubiliser et réduire le rendement • résine peut lier protéines non-spécifiques riches en histidine • n'augmente pas la solubilité
Glutathione S-Transférase (GST)	Glutathione	<ul style="list-style-type: none"> • aide à la solubilisation et au repliement des protéines de fusion • facile à détecter (anti-GST) • systèmes d'expression variés • purification simple • conditions de purification natives • haut rendement • bonne pureté de purification • résine peu coûteuse • étiquette peut aider à protéger contre protéases cellulaires non-spécifiques 	<ul style="list-style-type: none"> • étiquette très grosse • peut causer la formation d'aggrégats (cause insolubilité de protéine > 100kDa) • formation de dimères • clivage pour enlever l'étiquette est nécessaire (étape supplémentaire pouvant diminuer le rendement)
Maltose-binding Protein (MBP)	Amylose	<ul style="list-style-type: none"> • excellente pour la solubilisation • résine peu coûteuse • conditions d'élution natives • haut rendement 	<ul style="list-style-type: none"> • très grosse étiquette donc interfère avec la structure et fonction de la protéine de fusion • étiquette doit être enlevée lors de la purification
Avidine/Streptavidine (STREP)	Biotine/Streptavidine	<ul style="list-style-type: none"> • haute spécificité • excellente pureté de purification • petite étiquette • conditions d'élution natives 	<ul style="list-style-type: none"> • résine très coûteuse • n'aide pas à la solubilisation • faible rendement
FLAG	Anticorps monoclonal anti-FLAG	<ul style="list-style-type: none"> • haute spécificité • rendement moyen à bon • petite étiquette 	<ul style="list-style-type: none"> • résine très coûteuse • conditions d'élution difficiles pour l'intégrité de la protéine de fusion
Calmodulin-binding peptide (CBP)	Calmoduline	<ul style="list-style-type: none"> • haut rendement • haute spécificité • conditions d'élution natives 	<ul style="list-style-type: none"> • résine très coûteuse • n'aide pas à la solubilisation

(Baneyx, 1999; Lichty et al., 2005; Stevens, 2000; Tan et al., 2005; Terpe, 2003; Waugh, 2005).

Tableau 1 : Différentes étiquettes utilisées pour la purification de protéines eucaryotes.

Ce tableau illustre quelques exemples d'étiquettes utilisées lors de purification de protéines, particulièrement en système de surexpression bactérien. Les deux premières étiquettes, His₆ et GST, sont les plus couramment utilisées.

Les systèmes d'affinité décrits dans le tableau comportent plusieurs avantages et désavantages qui peuvent être importants selon le type de purification et la protéine à purifier. Il est donc important de bien évaluer toutes les possibilités et de bien connaître la protéine que l'on veut purifier avant de choisir l'étiquette d'affinité pour la purification. Par contre, le tableau démontre bien que les méthodes de purification les plus populaires sont celles qui utilisent l'hexamère d'histidine (His₆) et la glutathione S-transférase (GST) puisque ce sont ces méthodes qui sont le mieux décrites dans la littérature.

Tel que mentionné précédemment, le système d'expression choisi pour l'étude présentée au chapitre 3 est celui de la surexpression en bactéries d'une portion d'Est1p, avec l'étiquette GST en N-terminal. Une tentative de purification ultérieure avec une étiquette His₆ devant la protéine complète n'ayant pas porté fruit et ayant résulté en l'expression d'une protéine recombinante insoluble, nous avons opté pour le système GST dans le but de favoriser la solubilisation de la protéine recombinante désirée. Étant donné qu'il est possible qu'une grosse protéine recombinante portant l'étiquette GST soit insoluble, nous avons décidé d'exprimer seulement une portion de la protéine Est1p (voir la section Résultats du chapitre 3) (Terpe, 2003) pour favoriser la purification en conditions natives et maximiser le rendement de la purification.

CHAPITRE I

Démonstration de l'activité de la ribonucléase Rnt1p sur l'expression des sous-unités de la télomérase chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* comme un nouveau niveau de régulation de la télomérase.

Préambule

Une étude préliminaire a démontré que la délétion du gène *RNT1* causait une augmentation des niveaux d'ARN messagers des sous-unités de la télomérase ainsi qu'une hausse de la taille des télomères (voir Annexe 1). Afin de déterminer l'implication de la protéine Rnt1p sur la régulation de la télomérase chez *Saccharomyces cerevisiae*, des essais d'activité de télomérase ainsi que des immunobuvardages de type Western ont été effectués dans des souches de type sauvage, *rnt1*Δ et dans des cellules ayant un allèle thermosensible de *RNT1*, *rnt1-ts*.

I.I MATÉRIEL ET MÉTHODES

SOUCHES UTILISÉES

Les souches utilisées pour ces études sont TVL268 (*MATa ura3-52 ade2-101 lys2-801 leu2-Δ1 trp1-Δ1 his3-Δ200/CF⁺ [TRP1 SUP11]*) et YKF103 *MATa ura3-52 ade2-101 lys2-801 leu2-Δ1 trp1-Δ1 his3-Δ200/CF⁺ [TRP1 SUP11] ProA-EST2*) obtenues de Katherine L. Friedman (Friedman et Cech, 1999). Afin d'étudier l'effet de la délétion de *RNT1* sur la télomérase, un croisement entre la souche YKF103 et la souche DUY746 (*MATα leu2-3,112 his3 trp1 pep4 prc1 HIS3 :pet56 :rnt1*) (obtenue de D. Ursic) a été effectué. Le diploïde issu de ce croisement a été mis en sporulation et la dissection des tétrades a donné les haploïdes nommés NLYH15 (type sauvage) et NLYH12 (*rnt1Δ*) tous deux ayant l'étiquette Protéine A en N-terminal de *EST2*. Lors de l'analyse des tétrades, une vérification par PCR a été effectuée afin de s'assurer de la présence de l'étiquette dans chacune de ces souches. Les oligonucléotides utilisés comme amorces pour cette vérification sont 404B2 (5'-GTT TGG GCG TAT TTA CAT CTT TG-3') et RIprimerB (5'-CTG CTT AAA TTC TTT GAT ACG G-3').

Afin d'étudier en détails les effets de l'absence de Rnt1p sur la télomérase, une souche ayant un allèle thermosensible de *RNT1*, nommée *rnt1-ts* (Ge *et al.*, 2005), a été utilisée. Ce gène muté a été caractérisé par le groupe de Manuel Ares, Jr. (Nagel et Ares, 2000) et est maintenu sur un plasmide centromérique pRS315 avec lequel on transforme une souche *rnt1Δ*. Pour pouvoir étudier les effets graduels de la perte de Rnt1p sur la télomérase lorsqu'on place la souche thermosensible à température

restrictive, la souche NLYH12 (*rnt1* Δ *ProA-EST2*) a été transformée avec le plasmide pRS315-*RNT1* ainsi que pRS315-*rnt1-ts*.

La croissance des cellules, la mise en sporulation ainsi que la microdissection ont été faites selon les procédures standard pour la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Rose, 1990). Il est à noter que toutes les levures ont été poussées à 26°C jusqu'à DO de 1.0 (sauf dans le cas des cellules thermosensibles lorsqu'utilisées pour déterminer les effets de la perte graduelle de Rnt1p), soit la température permissive pour la croissance d'un mutant *rnt1* Δ . Pour la souche thermosensible, les cellules ont poussé jusqu'à densité optique de 1.0 à 26°C et ensuite diluées à une DO de 0.2. Elles ont ensuite été placées à 37°C pendant 24 heures et un échantillon a été pris après 8h à 37°C

EXTRACTION DE PROTÉINES TOTALES

Plusieurs techniques d'extraction de protéines ont été testées. La méthode retenue fut celle du moulin à café telle que décrite par les groupes de Michael Schultz (Schultz, 1999) et Daniel E. Gottschling (Peterson *et al.*, 2001) avec quelques modifications. La technique consiste à faire pousser un minimum d'un litre de culture, centrifuger les cellules, effectuer un lavage dans de l'eau froide et ensuite un autre lavage dans le tampon TMG (10 mM Tris-Cl pH 8.0, 1 mM MgCl₂, 10% v/v glycérol) + 0.1 mM DTT et 0.2M NaCl. À la fin, le culot de cellules est gelé très rapidement dans de l'azote liquide. Une fois congelé, le culot est moulu à l'aide d'un moulin à

café (Krupps, Canada) dans lequel 10 grammes de glace sèche en noix sont ajoutés par gramme de cellules congelées. Le culot et la glace sèche sont moulus pendant 90 secondes, dans la chambre froide, en agitant le moulin à café. La poudre est ensuite placée dans un bécher, sur glace. La poudre, une fois fondue, est resuspendue dans du TMG + 0.2 M NaCl, 0.2% v/v NP40, 0.2% v/v Triton X-100 et inhibiteurs de protéases (Roche Diagnostics, IN) à raison de 5 mL par litre initial de culture. Ensuite les extraits sont centrifugés pendant 1h30 à 100 000 x *g* à 4°C. Le surnageant représente un extrait total de protéines S-100. La concentration de l'extrait est ensuite déterminée à l'aide du *Bradford protein assay* (BioRad, Mississauga, ONT).

IMMUNOPRÉCIPITATION

La technique d'immunoprécipitation est effectuée telle que décrite initialement par le groupe de Elizabeth H. Blackburn (Greider et Blackburn, 1989) avec certaines modifications. L'immunoprécipitation se fait à l'aide de 120 µl de billes d'IgG sépharose (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Canada) que l'on incube avec 1.5 mg d'extrait total de protéines pendant 18 heures à 4°C (les billes sont en suspension à 50% dans le tampon TMG + 0.5 mM DTT et 0.5% v/v Tween-20). Des inhibiteurs de protéases Complete mini EDTA-free (Roche Diagnostics, Laval, Canada) ainsi que l'inhibiteur de ribonucléases RNasin (Promega, WI) ont été ajoutés dans les tampons et les extraits de protéines. Des lavages sont effectués dans du TMG + 0.2 M NaCl et, finalement, les billes sont resuspendues dans un volume de TMG + 0.5 mM DTT. Les produits de l'immunoprécipitation sont conservés à -80°C en aliquots de 10 µl.

IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN

L'immunobuvardage de type Western a été effectué afin de quantifier les niveaux de la protéine ProA-Est2p dans une souche de type sauvage et *rnt1Δ*. Des aliquots de 10µl des immunoprécipitations faites avec les différentes souches à analyser sont bouillis dans 1 volume de tampon Laemmli 2X (62.5 mM Tris pH 6.8, 25% v/v glycérol, 2% m/v SDS, 0.01% m/v bleu de bromophénol) pendant 5 minutes à 100°C afin de dénaturer les protéines. Les échantillons sont analysés par migration sur un gel SDS-PAGE 10%. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose Hybond-C (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Canada) à l'aide de l'appareil Mini Trans-blot Cell de BioRad (Mississauga, Canada) pendant deux heures à 85 V. La membrane est colorée au rouge Ponceau S afin de s'assurer de la qualité du transfert. Ensuite la membrane est bloquée dans du lait 5% m/v dissout dans du PBS-T (0.1% v/v Tween) pour au moins une heure à la température de la pièce ou toute la nuit à 4°C. La membrane doit être lavée 3 fois 10 minutes afin d'enlever la solution de blocage et ce dans du PBS-T froid sur une plaque agitatrice. La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps primaire qui est dirigé contre la portion Protéine A. Cet anticorps polyclonal anti-protéine A de lapin (Sigma, Canada) est utilisé en faisant une dilution 1:5000 dans du lait 1% m/v + PBS. L'incubation avec l'anticorps primaire se fait pendant une heure à température pièce avec légère rotation. La membrane est encore une fois lavée 3 fois 10 minutes dans du PBS-T. Ensuite, on incube avec l'anticorps secondaire anti-lapin conjugué à une peroxidase, provenant de l'âne (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Canada). L'anticorps est dilué 1:5000 dans du lait

1% m/v + PBS et la membrane est incubée pendant une heure à température pièce avec légère rotation. Après l'incubation, on effectue 3 derniers lavages dans du PBS-T avant de révéler avec les solutions de révélation ECL Plus (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Canada). Finalement, les résultats sont analysés et quantifiés à l'aide de l'appareil Storm Imager (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Canada) et le programme ImageQuant version 5.0 (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Canada).

ESSAI D'ACTIVITÉ DE TÉLOMÉrase In Vitro

Le protocole utilisé pour l'essai d'activité de télomérase *in vitro* a été légèrement modifié de celui décrit par le groupe de Thomas R. Cech (Friedman et Cech, 1999). L'essai consiste à incuber les immunoprécipitations ProA-Est2p (ayant également l'ARN *TLC1*) avec les réactifs nécessaires à la télomérase pour qu'elle fasse l'extension d'un oligonucléotide télomérique. Ensuite, les produits d'extension sont analysés sur un gel de polyacrylamide et l'intensité des bandes est quantifiée par rapport à un contrôle interne. Ainsi, l'activité de la télomérase *in vitro* pour les différentes souches utilisées peut être comparée. L'essai d'activité se fait en utilisant les aliquots de l'immunoprécipitation (2 par souches) centrifugés pendant 1 minute à 860 x g, à 4°C, afin d'enlever le surnageant en prenant soin de ne pas enlever de billes (il restera 5 µl de billes). Pour une même souche, deux immunoprécipitations sont utilisées: à une, 1 µl d'eau est ajouté et à l'autre, 1 µl de ribonucléase A 10 mg/ml (GE Healthcare, Canada). Le tout est incubé pendant 10 minutes à 30°C. Le traitement à la ribonucléase est effectué à titre de contrôle pour s'assurer que les

produits obtenus sont spécifiques à une extension faite par la télomérase. Suite à cette incubation, 1.5 µl d'un mélange appelé « Master Mix » sont ajoutés (290 mM Tris-Cl pH 8.0, 360 mM NaCl, 35% v/v glycérol, 18 mM MgCl₂, 3.6 mM spermidine, 3.6 mM DTT) ainsi que 1.1 µl de nucléotides à 1mM chaque (TTP, dATP, dCTP; bien que seulement le TTP est nécessaire, les autres sont ajoutés pour reproduire le plus possible les conditions *in vivo*), 1.5 µl de [α -³²P] dGTP dont l'activité spécifique est de 800 Ci/mmmole (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Canada) et 1.4 µl d'oligonucléotide télomérique NLTAG1-3, ayant pour séquence TAG GGT AGT AGT AGG G (Lue et Xia, 1998), synthétisé et purifié par la compagnie IDT DNA (Coralville, IA). Le mélange réactionnel est incubé pendant 30 minutes à 30°C. 1.5 µl de tampon d'arrêt (250 mM Tris-Cl pH 8.0, 250 mM EDTA pH 8.0, 2% m/v SDS) et 1.75 µl de protéinase K 20mg/ml (BioShop, Burlington, ONT) sont ajoutés et les tubes sont placés à 65°C pendant 30 minutes afin de s'assurer que la réaction est terminée et que les protéines sont dégradées par la protéinase K. Ensuite on ajoute 85µl d'eau et 1 µl d'oligonucléotide radiomarké en 5' d'une longueur de 12 nucléotides à titre de contrôle interne et avec une activité ajustée à 3000 cpm/µl. Une extraction au phénol-chloroforme est effectuée et la phase aqueuse contenant l'ADN est précipitée dans 500µl d'éthanol 100%, 66 µl d'ammonium acétate et 1µl de glycogène 20 mg/ml. La précipitation de l'ADN se fait à -20°C pour une période minimale d'une heure. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 30 minutes à une vitesse de 16 060 x g, à 4°C. L'éthanol 100% est enlevé pour faire un lavage dans 1ml d'éthanol 70%. Les culots sont asséchés et resuspendus dans 4 µl de tampon de formamide (80% v/v formamide, 10 mM EDTA pH 8.0, 1mg/ml xylène cyanol FF, 1 mg/ml bleu de

bromophénol). Les échantillons sont analysés par migration sur un gel de 20% polyacrylamide ayant 40 cm de longueur pendant 3h à 40 W. À noter qu'un oligonucléotide de 16 nucléotides marqué en 5' (à 3000 cpm/ μ l) est chargé de chaque côté des échantillons à titre de point de repère « +0 ». Le gel est ensuite déposé dans une cassette de détection pour le *PhosphorImager* (Storm Imager) pendant 18 heures. Les produits d'extension sont finalement analysés et quantifiés à l'aide du programme ImageQuant (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Canada).

MARQUAGE D'OLIGONUCLÉOTIDES AU [γ -³²P]ATP

Les deux oligonucléotides marqués en 5' servant de contrôle interne et de point de repère ont été marqués à l'aide de l'enzyme T4 polynucléotide kinase provenant d'USB (Baie d'Urfé, QC) à l'aide du protocole décrit par la compagnie.

I.II RÉSULTATS

On sait que la télomérase de la levure *Saccharomyces cerevisiae* est importante au niveau du maintien de la longueur des télomères, ce qui a pour but d'assurer la réplication complète des chromosomes à chaque division. La télomérase est formée de plusieurs sous-unités (Est1p, Est2p, Est3p, *TLC1* et Cdc13p) qui agissent en complexe et celui-ci est hautement régulé dans le cycle cellulaire. Par contre, bien peu est connu sur les mécanismes de régulation de l'expression de chacune des sous-unités de la télomérase de façon individuelle. Une étude

préliminaire mesurant les niveaux d'expression des ARN messagers (à l'aide d'une puce transcriptionnelle ainsi que par buvardage de type Northern) d'une souche *rnt1Δ* avaient démontré une hausse significative de tous les ARNm codant pour les sous-unités de la télomérase par rapport à une souche de type sauvage (*Larose et al. 2006*, soumis ; voir annexe 1 pour figures).

Afin de déterminer si cette hausse en expression des ARNm des sous-unités de la télomérase se traduit par une hausse globale de l'activité de télomérase, un buvardage de type Southern a été effectué par Stéphanie Larose (*Larose et al. 2006*) et le résultat a démontré une hausse de la taille des télomères dans une souche *rnt1Δ* par rapport au type sauvage.

Un immunobuvardage de type Western (Figure 12A) a été effectué afin de déterminer si la hausse des ARN messagers codant pour les sous-unités de la télomérase résulte en une augmentation des protéines de l'holoenzyme. Aucun anticorps contre les différentes sous-unités de la télomérase chez la levure n'est disponible à ce jour. Une souche dans laquelle la protéine Est2p porte une étiquette Protéine A (ProA-Est2p) en N-terminal a donc été utilisée pour la quantification. Par contre, la quantité des autres protéines du complexe n'a pu être effectuée car les souches exprimant les protéines portant des étiquettes n'étaient pas disponibles. Des immunoprécipitations ont donc été effectuées à l'aide de billes recouvertes d'IgG. Ce type de billes peut facilement être utilisé afin d'immunoprécipiter des protéines portant l'étiquette ProA puisque la protéine A possède de l'affinité pour l'IgG. Une

immunoprécipitation sur un extrait de protéines d'une souche où Est2p ne possède pas d'étiquette ProA (Figure 12A, piste 1) est utilisée à titre de contrôle négatif. La quantification des signaux indique une augmentation de la quantité de ProA-Est2p de 2.9 fois dans une souche *rnt1Δ* par rapport au type sauvage (Figure 12, comparer les pistes 2 et 3) avec un écart type de 0.62 à la suite de trois essais indépendants. À noter que toutes les quantifications ont été faites en prenant compte du contrôle interne, soit la chaîne lourde de l'IgG (révélée par l'anticorps secondaire).

L'activité *in vitro* de la télomérase a finalement été analysée et le résultat est démontré à la figure 12B. Un contrôle négatif dans lequel la protéine Est2p ne possède pas d'étiquette a été utilisé afin de s'assurer que les produits obtenus sont vraiment issus de l'activité de la télomérase (Figure 12B, pistes 1 et 2). Également dans le but d'assurer que les produits obtenus proviennent de la télomérase, les échantillons dans les pistes 1, 3 et 5 ont été traités à la ribonucléase A afin de détruire la molécule d'ARN *TLC1*, abolissant ainsi toute activité spécifique à la télomérase. Après quantification, l'activité de télomérase est en moyenne 2.4 fois plus élevée dans une souche *rnt1Δ* par rapport au type sauvage et l'écart type de 3 essais indépendants est de 0.78. (Figure 12B, comparer les pistes et 6).

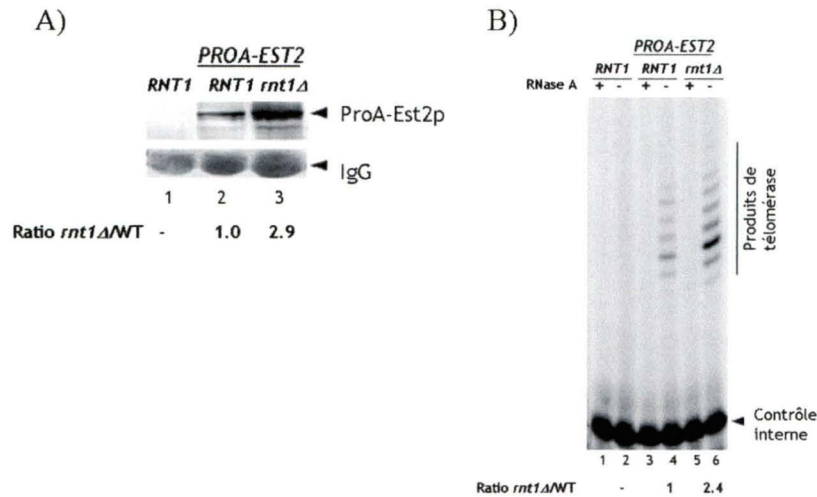


Figure 12 : Caractérisation des phénotypes télomériques reliés à la délétion de *RNT1*.

A) Analyse de l'expression de ProA-Est2p dans une souche WT et *rnt1Δ* par immunobuvardage de type Western. Les extraits protéiques immunoprécipités sont migrés sur un SDS-PAGE 10%, transférés sur membrane de nitrocellulose et ProA-Est2p a été visualisée à l'aide de l'anticorps anti-Protéine A. Les membranes incubées avec l'anticorps secondaire sont exposées au ECL Plus et les résultats sont visualisés à l'aide de l'appareil StormImager (option fluorescence). Les niveaux de ProA-Est2p sont quantifiés par rapport au contrôle interne et les niveaux relatifs de protéines sont calculés par rapport à la souche WT. B) Essai d'activité de télomérase *in vitro*. La télomérase est partiellement purifiée à l'aide de billes IgG sépharose et une extension d'amorce télomérique est effectuée à l'aide de [α - P^{32}] dGTP et les échantillons sont migrés sur gel 20% polyacrylamide/8M urée. Les produits de télomérase sont finalement visualisés à l'aide de l'appareil Storm PhosphorImager. Les produits sont quantifiés par rapport au contrôle interne et l'activité de télomérase est calculée relativement aux produits obtenus dans le type sauvage.

Dans le but de démontrer que Rnt1p agit spécifiquement sur l'expression des sous-unités de la télomérase, une souche exprimant un allèle thermosensible de *RNT1*, *rnt1-ts*, a été utilisée. Des résultats obtenus par Stéphanie Larose (Larose et al. 2006) ont démontré que l'action de Rnt1p sur les ARN messagers codant pour les protéines de la télomérase est spécifique et la disparition graduelle de la protéine Rnt1p-ts lorsque les cellules sont poussées à 37°C cause le même phénotype que les cellules *rnt1Δ*, c'est-à-dire que les quantités d'ARNm augmentent au fur et à mesure que la protéine disparaît.

Afin de déterminer les effets de la perte graduelle de Rnt1p sur la télomérase, un immunobuvardage de type Western a été effectué sur des extraits totaux immunoprécipités des souches NLYH12 + pRS315-*RNT1* (exprime Rnt1p et ProA-Est2p) et NLYH12 + pRS315-*rnt1-ts* (exprime Rnt1p-ts, et ProA-Est2p) afin d'analyser les quantités de protéines. En principe, les niveaux de protéines ProA-Est2p devraient augmenter en fonction du temps passé à 37°C dans le mutant thermosensible, au fur et à mesure que Rnt1p^{ts} disparaît. La figure 13A représente le résultat obtenu (l'expérience a été répétée 3 fois). Les contrôles négatif (Est2p sans étiquette) et positif (souche de type sauvage avec ProA-Est2p) se retrouvent dans les pistes 1 et 2 respectivement. Lorsque les cellules sont poussées à 26°C, les pistes 3 et 4 démontrent que la quantité de ProA-Est2p est à peu près la même dans la souche *RNT1* et dans la souche *rnt1-ts*. Par contre, lorsque les cellules passent 8 heures à 37°C, il y a une différence majeure dans la quantité de ProA-Est2p (Figure 13A, pistes 5 et 6). En fait, le type sauvage possède des niveaux non-détectables de protéine alors que dans *rnt1-ts* ProA-Est2p est détectée. Finalement, après 24 heures à 37°C, ProA-Est2p ne peut être détectée dans aucune des deux souches. Pour cette raison, aucune quantification n'a pu être effectuée.

Des essais d'activité de télomérase ont également été effectués sur les mêmes échantillons immunoprécipités (Figure 13B). Un contrôle négatif dans lequel *EST2* ne possède pas d'étiquette ProA a été utilisé (Figure 13B, pistes 2 et 3) et un traitement à la ribonucléase A a été fait afin d'assurer la spécificité des produits obtenus (Figure 13B, pistes paires excepté 18). Le point de départ (les cellules poussées à 26°C) se

situe aux pistes 7 et 9 de la Figure 13B. L'intensité du signal étant plus fort dans le mutant thermosensible (Figure 13B, piste 9), il y a donc une plus grande activité dès le départ dans ce mutant par rapport au type sauvage. Suite au changement de température (« shift ») de 26°C à 37°C, des échantillons ont été pris après 8 heures et 24 heures. Le résultat attendu était que l'activité de télomérase augmenterait de façon graduelle dans le mutant thermosensible suite au shift des cultures à 37°C étant donné que la protéine Rnt1p-ts disparaît de façon graduelle. Par contre, les essais d'activité de télomérase faits à partir de ces échantillons démontrent une absence quasi-totale d'activité même après 8 heures à 37°C, et ce autant pour le type sauvage que pour *rnt1-ts* (Figure 13B, pistes 11, 13, 15 et 17).

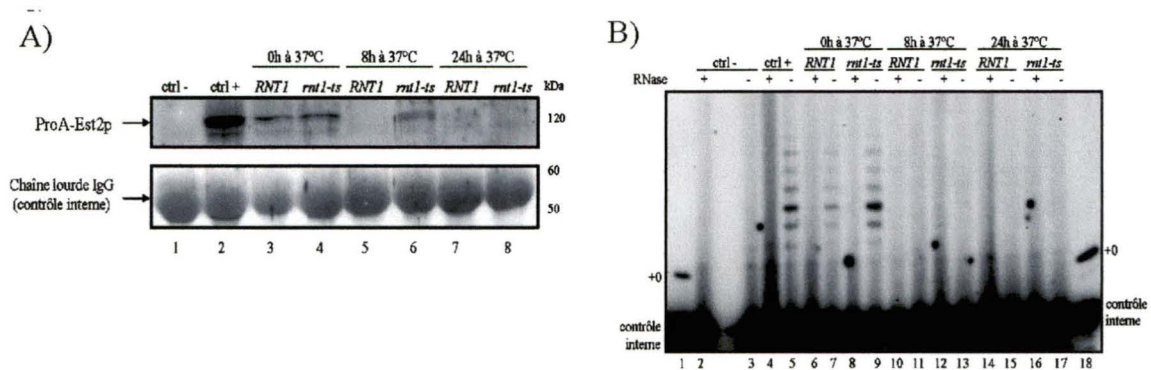


Figure 13 : Utilisation de la souche exprimant l'allèle thermosensible *rnt1-ts* afin de déterminer la spécificité des effets de la ribonucléase sur la télomérase à 37°C.

A) Immunobuvardage de type Western comparant les niveaux de ProA-Est2p dans les souches WT et *rnt1-ts* suite à un shift de 26°C à 37°C. Les échantillons ont été traités tel que mentionné à la figure 2C et visualisés à l'aide du Storm Imager. B) Analyse et comparaison de l'activité de télomérase *in vitro* dans une souche WT et *rnt1-ts* suite à un shift de 26°C à 37°C. Les échantillons dans les pistes paires ont été traités à la ribonucléase A pour s'assurer que les produits obtenus sont spécifiques à la télomérase. Voir la description de l'essai à la figure 12B. Les produits de télomérase sont visualisés à l'aide de l'appareil Storm PhosphorImager.

Afin d'expliquer les résultats obtenus, on pourrait imaginer qu'un mécanisme général de régulation ou de dégradation des protéines à 37°C est impliqué dans le phénomène observé. Un article provenant du groupe de Daniel E. Gottschling

(Gardner *et al.*, 2005) discute d'un nouveau contrôle de qualité des protéines au niveau du noyau par la protéine San1p. Cette dernière aurait pour fonction de diriger les protéines aberrantes vers le système de dégradation du protéasome. Le mécanisme par lequel la protéine San1p reconnaît les protéines aberrantes et la propriété de San1p lui permettant de les reconnaître sont toutefois inconnus par les auteurs. Étant donné la présence de l'étiquette ProA devant Est2p dans les souches utilisées, il est probable que ProA-Est2p soit dirigée vers la dégradation par San1p, à 37°C, car la présence de l'étiquette ferait en sorte que la protéine adopte une conformation aberrante et différente de celle à température permissive (Sabourin *et al.*, 2007). Par contre, puisque l'analyse de la sénescence n'a pas été effectuée pour les cellules exprimant ProA-Est2p à 37°C, il aurait peut-être été possible d'observer que les cellules sénescient au fil des divisions, à 37°C, indice que ProA-Est2p est bel et bien dégradée.

Les expériences ont donc été refaites mais en faisant le shift à 33°C au lieu de 37°C. Encore une fois, les résultats obtenus allaient à l'encontre de notre hypothèse voulant que la disparition graduelle de Rnt1p-ts, lorsque le mutant thermosensible est placé à température restrictive de 33°C, causerait une augmentation graduelle de la quantité de ProA-Est2p, ce qui démontrerait la spécificité de l'endonucléase sur la télomérase. Par contre, tel que démontré à la figure 14, les résultats sont similaires à ceux obtenus lorsque le shift a été effectué à 37°C, bien que les pertes (causée par une dégradation?) de ProA-Est2p et d'activité de télomérase s'effectuent plus tard dans le temps.

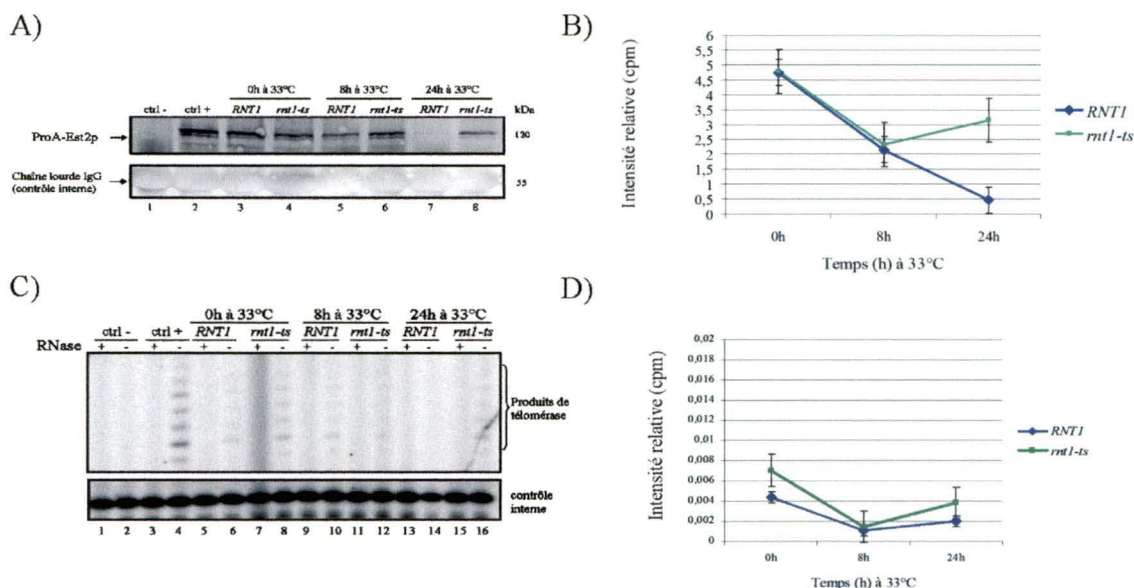


Figure 14 : Détermination de la spécificité de Rnt1p sur la télomérase par l'utilisation de l'allèle thermosensible *rnt1-ts* à température restrictive de 33°C.

A) Immunobuvardage de type Western comparant les niveaux de ProA-Est2p dans les souches WT et *rnt1-ts* suite à un shift de 26°C à 33°C. Les échantillons ont été traités tel que mentionné à la figure 1.1A et visualisés à l'aide du Storm Imager. B) Représentation graphique de trois immunobuvardages de type Western indépendants. Les valeurs ont toutes été calculées par rapport au contrôle interne. C) Analyse et comparaison de l'activité de télomérase *in vitro* dans une souche WT et *rnt1-ts* suite à un shift de 26°C à 33°C. Les échantillons dans les pistes impaires ont été traités à la ribonucléase A pour s'assurer que les produits obtenus sont spécifiques à la télomérase. Voir la description de l'essai à la figure 1.1B. Les produits de télomérase sont visualisés à l'aide de l'appareil Storm PhosphorImager. D) Représentation graphique de 2 essais d'activité de télomérase indépendants. Les valeurs ont toutes été calculées par rapport au contrôle interne.

Il est donc évident, suite aux résultats obtenus, que Rnt1p a un effet spécifique sur la télomérase mais l'utilisation du mutant exprimant l'allèle thermosensible *rnt1-ts* ne peut clairement le démontrer puisqu'un mécanisme plus général de dégradation semble agir sur nos souches lorsqu'elles sont placées à 33°C ou 37°C. La baisse générale en protéines aux figures 13A et 14A peut s'expliquer par le fait que lorsque les cellules sont placées à ces températures, les protéines impliquées dans le phénomène du choc thermique sont activées et tous les processus cellulaires sont déstabilisés, entraînant la dégradation de plusieurs protéines. Ensuite, les cellules s'adaptent à la température élevée et le choc thermique se termine. Ainsi, tout

redevient stable et les niveaux de protéines redeviennent normaux (Causton et al., 2001; Gasch et al., 2000; Gasch et Werner-Washburne, 2002; Mattanovich et al., 2004). Tel que démontré à la figure 14B, suite à la perte de la protéine ProA-Est2p, il y a récupération de la protéine après 24 heures passées à 33°C. Ceci s'expliquerait par l'inhibition des effets du choc thermique et stabilisation des processus cellulaires à cette température.

De plus, bien que la protéine ProA-Est2p est bien exprimée après 8h à 37°C dans les cellules *rnt1-ts* et après 8h à 33°C dans les cellules de type sauvage et *rnt1-ts*, il nous est impossible de détecter de l'activité de télomérase dans ces extraits. Il se peut que la télomérase elle-même, au niveau enzymatique, soit peu ou pas fonctionnelle lorsqu'elle est incubée à des températures plus élevées que 30°C ce qui entraînerait l'absence d'activité de télomérase dans les échantillons qui ont été à des températures élevées. Par contre, les expériences effectuées à l'aide de la souche *rnt1Δ* nous permettent de supposer l'existence d'un mécanisme de régulation de la télomérase par la protéine Rnt1p .

CHAPITRE II

Purification de l'holoenzyme de la télomérase chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* en conditions natives (sans étiquette) afin de déterminer de nouveaux partenaires de la télomérase, les rapports stœchiométriques ainsi que les interactions entre les différentes protéines du complexe enzymatique.

Préambule

Il y a quelques années, des études ont montré de façon génétique les différentes interactions entre les sous-unités protéiques de l'holoenzyme de la télomérase. Par contre, bien peu de données biochimiques sont disponibles à ce jour. Nous avons donc débuté un projet ayant pour objectif de purifier le complexe natif de la télomérase. Cette purification nous permettrait de déterminer de nouveaux partenaires de la télomérase et d'étudier les rapports stœchiométriques ainsi que les interactions entre les protéines. Pour ce faire, une purification sur FPLC, des immunobuvardages de type Western, des RT-PCR ainsi que des essais d'activité de télomérase *in vitro* ont été effectués dans le but d'isoler et d'analyser l'holoenzyme.

II.I MATÉRIEL ET MÉTHODES

SOUCHES UTILISÉES

Les souches utilisées pour cette étude sont TVL268 et YKF103, décrites au Chapitre 1. Même si l'objectif est de purifier le complexe en conditions natives, la souche où l'étiquette Protéine A est placée en N-terminal de EST2 a été utilisée afin de suivre les étapes de la purification par immunobuvardage de type Western étant donné que les anticorps contre les sous-unités de la télomérase ne sont pas disponibles.

EXTRACTION DE PROTÉINES TOTALES

La technique utilisée pour extraire les protéines est la même que celle décrite au Chapitre 1. Les extraits finaux ont été filtrés sur filtre 0.22 µm avant d'être injectés sur la colonne DEAE.

PURIFICATION SUR COLONNE DEAE

La purification partielle de la télomérase a été effectuée telle que publiée par le groupe de Elizabeth H. Blackburn (Cohn et Blackburn, 1995) avec modifications. L'utilisation d'un système FPLC ÄKTA Explorer (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Qc) est l'une des modifications majeures apportées à la technique publiée. Une colonne de 1 mL de DEAE sepharose Fast Flow (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Qc) a été utilisée.

La DEAE est une résine échangeuse d'anions faible et lie l'ADN, l'ARN ou des protéines de charge négative. La colonne est équilibrée dans le tampon TMG (10 mM Tris-Cl pH 8.0, 1 mM MgCl₂, 10% v/v glycérol) + 0.2 M NaCl, 0.2% v/v NP40 et 0.2% v/v Triton X-100. L'échantillon d'environ 100 mg de protéines totales est ensuite appliqué sur la colonne à un débit de 0.5 mL/min lors de l'injection et de 1.0 mL/min lors des lavages et des éluions. Les protéines sont éluées par palier en utilisant du tampon TMG contenant différentes concentrations de sels: 300 mM acétate de sodium, 600 mM acétate de sodium et 900 mM acétate de sodium. La télomérase devrait être élue à une concentration de sels d'environ 900 mM (Lue et Peng, 1998; Lue et Xia, 1998). Une élution finale est effectuée avec du TMG contenant 1.0 M acétate de sodium afin d'enlever tout ce qui pourrait être lié à la colonne. Finalement, la colonne de DEAE est rééquilibrée dans le tampon TMG ne contenant pas de détergents ni de sels. Des fractions de 1mL ont été recueillies. Voir à la section des résultats pour le chromatogramme de la purification.

IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN

La technique d'immunobuvardage de type Western effectuée pour l'étude de la purification de la télomérase sur colonne de DEAE est la même que celle décrite au chapitre 1. Par contre, en plus d'utiliser des immunoprécipitations de 10µl, 15µl des fractions DEAE ont été déposées sur les gels.

EXTRACTION D'ARN

Afin de déterminer si la purification par FPLC sur colonne DEAE purifie le complexe de la télomérase, des essais de RT-PCR ont été effectués sur l'ARN extrait des fractions obtenues. À 200 µl de chaque fraction intéressante (totale, non-liée, 300 mM, 550 mM et 900 mM NaOAc), 1 µl de RNasin ont été ajoutés et les fractions ont été traitées avec 20 µl de protéinase K 20 mg/ml. Le tout a été incubé pendant 15 minutes à 37°C. Ensuite, 2 extractions au phénol-chloroforme-isoamyl ont été faites ainsi qu'une extraction au chloroforme-isoamyl. Les surnageants contenant l'ARN ont ensuite été précipités dans 1/10 de volume de LiCl 5M et 2 volumes d'éthanol 100% à -20°C pendant 30 minutes. Les culots sont ensuite lavés 3 fois dans l'éthanol 70% puis séchés et resuspendus dans 50 µL d'eau traitée au diéthylpyrocarbonate (DEPC). La préparation de l'eau traitée au DEPC se fait comme suit : à 100 mL d'eau bidistillée, 100 µL de DEPC sont ajoutés. Le tout est mélangé vigoureusement dans un erlenmeyer et placé à 37°C pendant 2-3 jours (ou 90°C toute la nuit) afin de permettre l'évaporation du DEPC. Finalement, l'eau traitée est stérilisée.

RT-PCR (Reverse Transcription PCR)

Afin d'amplifier une partie de l'ARN *TLC1* et de vérifier s'il est présent dans les fractions DEAE obtenues, des réactions de RT-PCR ont été effectuées sur l'ARN extrait des différentes fractions. Les séquences des oligonucléotides ayant servi d'amorce dans la réaction de PCR sont les suivantes : l'oligonucléotide P₀ (amorce

pour la transcription inverse) a pour séquence 5'- GAT CAT CAC GGT GCC GGA TCC TTG TGT GTG GGT GTG GTG A -3'. La séquence de l'oligonucléotide P₁ est 5'- TGT GCG CAA TTT GTG GTT TTT TAT -3' et celle de l'oligonucléotide P₂ est 5'- GTG ATC TGC AGA TCA TCA CGG TGC CGG ATC C -3'. Les oligonucléotides ont été synthétisés et purifiés par la compagnie IDT DNA (Coralville, IA).

De façon plus détaillée, la réaction de RT-PCR se divise en deux parties. La première partie consiste à produire un ADNc à partir de l'ARN *TLC1* présent dans les fractions. Pour faire la réaction, 3 séries des mêmes échantillons sont utilisées: 1) sans RT, 2) normal 3) traités à la ribonucléase (RNase). Avant d'effectuer la transcription inverse, tous les échantillons sont traités à la déoxyribonucléase (DNase) afin d'éliminer toute trace d'ADN qui pourrait produire des faux-positifs. Une série d'échantillons est traitée à la RNase en plus de la DNase afin de s'assurer que les produits obtenus sont dépendants de l'ARN et non pas dus à de la contamination par de l'ADN résistant au traitement DNase. Le traitement à la DNase est effectué à l'aide de la DNase provenant de GE Healthcare (Baie d'Urfé, Canada). La compagnie suggère de faire la réaction de DNase dans du 10X Assay Buffer (40 mM Tris-Cl pH 7.5, 6 mM MgCl₂). Donc la réaction de DNase est effectuée sur 5µl d'ARN extrait des fractions DEAE auxquels 2µl d'enzyme à 10 unités/µl et 1µl de 10X Assay Buffer sont ajoutés. Le volume de la réaction est complété à 10µl avec de l'eau DEPC. En même temps, à une série d'échantillon, 1µl de RNase 5mg/ml est ajouté. Les échantillons sont placés à 37°C pendant 30 minutes. Les enzymes sont ensuite

inactivées à 65°C pendant 10 minutes et finalement, le tout est placé sur glace. Les réactions de transcription inverse (RT) ont été effectuées selon la méthode décrite par la compagnie Invitrogen (Burlington, Canada), compagnie d'où provient l'enzyme Superscript™ II Reverse Transcriptase, utilisée pour les réactions de RT. Les réactions de RT sont purifiées sur des colonnes UltraClean™ PCR Clean-up (BioCan, Mississauga, Canada) et l'ADN élué avec 35µl de TE pH 8.0. Les réactions de PCR sont effectuées sur 10µl d'ADNc. À ces 10µl d'ADNc, 10pmoles de chaque amorce (P₁ et P₂), 0.5µl d'un mélange de dNTPs où chaque dNTP est à une concentration de 10 mM (Roche Diagnostics, Laval, Canada), 1/10 volume de 10X PCR buffer (500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 100 mM Tris-Cl pH 9.0) et 2.5 unités de Taq ADN polymérase (purifiée par Catherine Desrosiers) sont ajoutés. Une réaction contrôle sans ADNc a été faite pour s'assurer que les réactifs ne sont pas contaminés par de l'ADN. La réaction de PCR s'effectue en dénaturant pendant 30 secondes à 94°C, l'appariement des amorces se fait à 55°C pendant 30 secondes puis l'extension par la polymérase s'effectue à 72°C pendant 30 secondes. Ces trois étapes sont répétées 30 fois (30 cycles) puis une extension finale de 5 minutes à 72°C est faite. Les produits sont analysés par migration sur un gel de 2% agarose-TAE. Le gel est ensuite trempé dans une solution de bromure d'éthidium et, finalement, les produits de RT-PCR sont visualisés à l'aide de l'appareil Gel-Doc 2000 (BioRad, Mississauga, Canada).

ESSAI D'ACTIVITÉ DE TÉLOMÉRASE MODIFIÉ

Afin d'effectuer les essais d'activité de télomérase sur les fractions obtenues de la purification DEAE, les réactions ont dû être ajustées en fonction du volume de fraction utilisée. Au chapitre 1, l'essai d'activité de télomérase est effectué sur 5µl de billes et le volume final de mélange réactionnel ajouté est de 5µl. L'essai sur les fractions a été effectué de la même façon que précédemment décrit au chapitre 1. Par contre, dans le cas des fractions DEAE, 15µl de ces fractions étant utilisés (3 fois plus de volume que lors de l'essai sur les immunoprécipitations), 3 fois plus de tous les réactifs ont été ajoutés aux fractions excepté le [α - 32 P] dGTP qui lui est demeuré à 1.5µl mais l'activité spécifique est passée de 800 Ci/mmmole à 3000 Ci/mmmole (Perkin Elmer, Woodbridge, Canada).

II.II RÉSULTATS

La télomérase de *Saccharomyces cerevisiae* est constituée de plusieurs protéines qui interagissent entre elles soit directement, via des interactions protéines-protéines ou indirectement via la composante ARN *TLC1*. *In vivo*, l'activité de télomérase nécessite la présence de toutes les sous-unités (Lendvay *et al.*, 1996) : Est1p, Est2p, Est3p, Cdc13p et l'ARN *TLC1*. Par contre, *in vitro*, seulement Est2p et *TLC1* sont nécessaires. Ces données concernant les sous-unités de la télomérase ont été recueillies en majorité suite à des expériences génétiques. Étant donné qu'il est impossible de détecter la télomérase dans des extraits cellulaires bruts, bien peu de choses sont connues de façon biochimique, comme par exemple le rapport stœchiométrique entre les différentes protéines. Certaines interactions entre les

protéines ont été déterminées par co-immunoprécipitation en utilisant des protéines étiquetées, mais jamais en conditions natives (Hughes *et al.*, 2000). Les données biochimiques obtenues suite à une purification du complexe enzymatique de la télomérase pourraient nous permettre de mieux comprendre les mécanismes de régulation de la télomérase : au niveau de son recrutement (quels facteurs sont impliqués dans la liaison de la télomérase aux télomères), au niveau des protéines chaperones qui pourraient être impliquées autant dans la formation du complexe enzymatique que dans le recrutement et finalement, au niveau de l'activité enzymatique telle quelle (constante de dissociation, processivité, recyclage de l'enzyme, etc.).

La purification de la télomérase via l'utilisation de la résine DEAE semblait être un bon choix pour débiter nos étapes de purification puisque plusieurs groupes purifient déjà la télomérase de façon partielle en utilisant cette résine. Par contre, étant donné que cette méthode ne purifie que partiellement la télomérase, il sera donc nécessaire d'effectuer d'autres étapes de purification qui augmenteront la pureté du complexe (au moins jusqu'à 95%) et augmenter la quantité de protéines finales (les étapes de purification sont illustrées à la figure 11 de l'Introduction).

Pour débiter, une purification sur FPLC a donc été effectuée sur des extraits totaux de protéines et le chromatogramme de la purification est démontré à la figure 15. La courbe bleue est la lecture de la densité optique à 280nm, donc représente les protéines dans les fractions. La courbe brune représente la conductivité et réagit aux

différentes concentrations de sel. Les lignes pointillées rouges représentent chaque fraction. L'ordonnée de gauche indique des milli-unités arbitraires (mAU) de densité optique. L'ordonnée de droite représente la conductivité en milli-Siemens/cm (mS/cm). L'abscisse représente le volume (mL) d'échantillon.

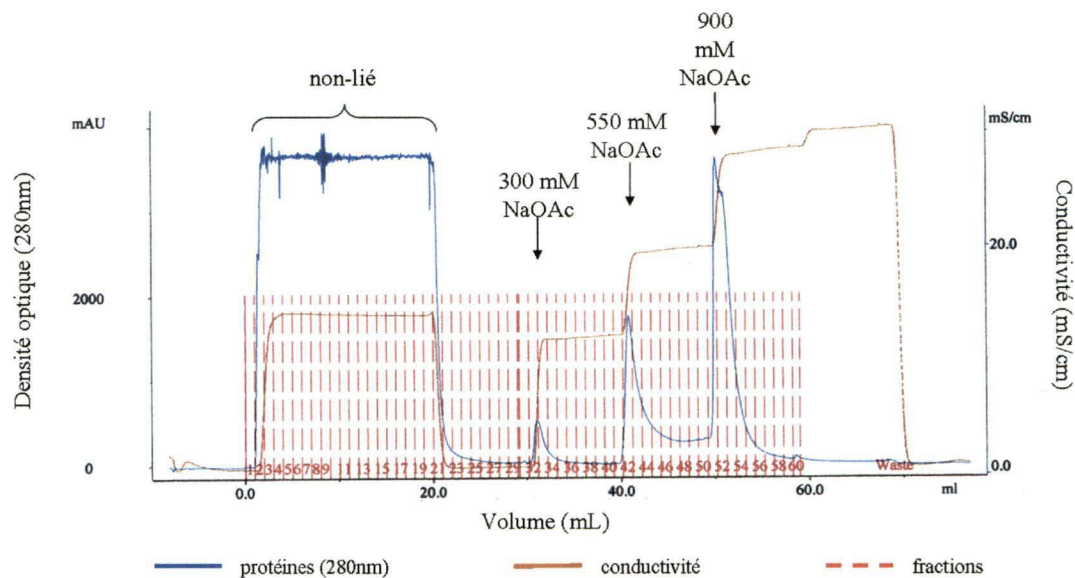


Figure 15 : Chromatogramme de la purification de la télomérase sur colonne DEAE.

Des extraits totaux de protéines ont été injectés sur une colonne de 1mL DEAE à raison de 0.5mL/min. Le non-lié est indiqué et représente les protéines qui ne sont pas liées à la résine. Des lavages dans du TMG + 300 mM NaOAc et 600 mM NaOAc ont été effectués afin d'enlever les protéines qui ne sont pas fortement liées (non-spécifiques) et l'élution finale, où la télomérase est attendue, est effectuée avec du TMG + 900 mM NaOAc. Les tampons pour les lavages/élution ont été injectés à un débit de 1mL/min. Courbe bleue = protéines (280nm); courbe brune = conductivité (mS/cm); pointillé rouge.

Afin de déterminer la présence de Est2p dans les fractions obtenues lors de la purification sur colonne DEAE, un immunobuvardage de type Western a été fait. Puisque la purification a été effectuée sur des extraits totaux de protéines contenant une version étiquetée de Est2p, ProA-Est2p, il était donc possible de suivre la présence de ProA-Est2p au fil des différentes étapes de purification. À la piste 1 de la figure 16, 15µl d'un extrait de protéines totales provenant de la souche où Est2p ne possède pas d'étiquette protéine A ont été chargés à titre de contrôle négatif. Un

aliquot de 10µl d'une immunoprécipitation faite sur un extrait de protéines totales provenant d'une souche exprimant ProA-Est2p a été chargé dans la piste 7 à titre de contrôle positif. Les pistes 2 à 6 représentent les différentes étapes de purification. Il est possible de détecter la présence de ProA-Est2p dans la piste où l'extrait total a été chargé et dans le non-lié mais les pistes ont due être surchargées puisque ProA-Est2p est très faiblement exprimée dans la levure. Dans les pistes 3 à 6, 15µl des fractions à 300 mM NaOAc, 550 mM NaOAc et 900 mM NaOAc respectivement ont été chargés. ProA-Est2p n'est pas présente dans la fraction à 300 mM NaOAc. En principe, la télomérase aurait dû être détectée seulement dans l'élution à 900 mM NaOAc mais elle est présente autant dans la fraction à 550 mM NaOAc que 900 mM NaOAc. Néanmoins, ces résultats indiquent que la télomérase peut être purifiée de façon partielle à l'aide d'une colonne DEAE et que les éluions effectuées à l'aide de 550 mM NaOAc et 900 mM NaOAc libèrent une certaine quantité de ProA-Est2p.

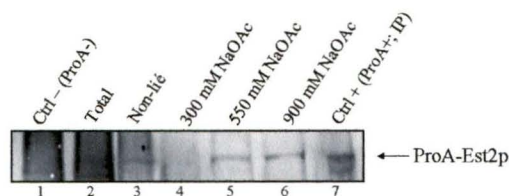


Figure 16 : Immunobuvardage de type Western sur les échantillons obtenus suite à la purification partielle de la télomérase sur colonne DEAE.

L'extrait protéique provenant d'une souche exprimant la forme non-étiquetée d'Est2p (piste 1, contrôle négatif), un aliquot d'une immunoprécipitation faite sur un extrait protéique d'une souche exprimant ProA-Est2p (piste 7, contrôle positif) ainsi que 15µl des fractions obtenues lors de la purification DEAE (pistes 2 à 6) sont analysés sur 10% SDS-PAGE et les protéines transférées sur membrane de nitrocellulose. Les protéines sont ensuite révélées à l'aide du ECL Plus provenant de GE Healthcare et les résultats sont visualisés et analysés à l'aide de l'appareil Storm Imager (GE Healthcare). ProA-Est2p est identifiée à droite (←).

La purification de la télomérase se faisant en conditions natives, il était important de s'assurer que la portion *TLC1* de l'holoenzyme de la télomérase se

trouvait également dans les fractions obtenues. La présence de *TLC1* dans les fractions est importante puisque la portion ARN de la télomérase ainsi que la protéine Est2p sont toutes deux essentielles à l'activité *in vitro*. Des essais de RT-PCR (*reverse transcription PCR*) ont donc été effectués afin de détecter la présence (ou l'absence) de *TLC1* dans les différentes fractions obtenues. La réaction de RT-PCR est illustrée et expliquée à la figure 17.

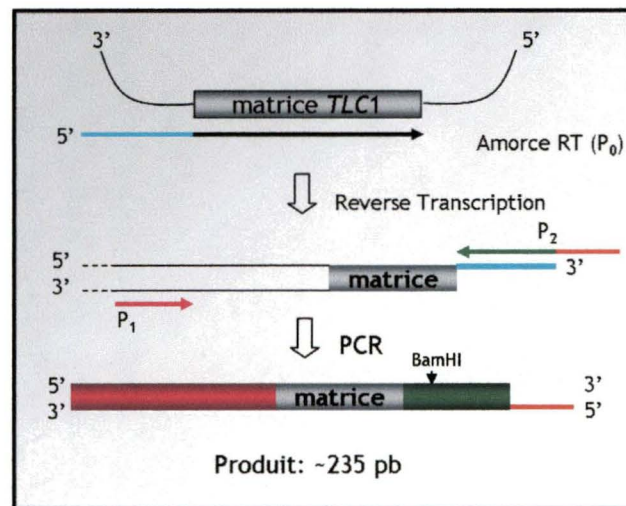


Figure 17 : Schéma représentant la réaction de RT-PCR et les amorces utilisées.

L'amorce P_0 sert à la transcription inverse de *TLC1* en s'hybridant dans la matrice (simple brin). Cette amorce possède une séquence en surplus (« flap ») en 5' qui servira à amplifier lors du PCR. Ce flap est ajouté afin d'assurer la spécificité de l'amplification. Après la transcription inverse, l'amorce P_1 s'hybride en 3' de la matrice et l'amorce P_2 s'hybride dans le flap. Le produit attendu est d'une longueur d'environ 235 pb. À noter que le flap possède la séquence reconnue par l'enzyme de restriction BamHI afin de vérifier la spécificité du produit obtenu, s'il y a lieu.

Différents contrôles ont d'abord dû être effectués afin de s'assurer de la spécificité des essais de RT-PCR sur l'ARN extrait des fractions. Ces contrôles sont illustrés à la figure 18. De façon plus détaillée, il est important de s'assurer que la réaction de transcription inverse est ARN-dépendante et que la réaction de PCR subséquente ne s'effectue pas sur de l'ADN contaminant. Pour ce faire, l'ARN extrait à partir d'un extrait de protéines S-100 est traité à la déoxyribonucléase (DNase; piste

6), à la ribonucléase (RNase; piste 7) et aux deux nucléases ensemble (piste 8). En principe, un produit d'environ 240 pb est attendu seulement pour les échantillons traités à la DNase puisque tous ceux traités à la RNase auront perdu l'ARN qui sert de matrice lors de la transcription inverse. Un contrôle sans aucun traitement aux nucléases est également effectué (piste 5). De plus, d'autres échantillons sont également analysés à titre de contrôles négatifs, toujours dans le but d'assurer la spécificité lors de la réaction de RT. La réaction de transcription inverse est effectuée sans transcriptase inverse (piste 2), sans ARN (piste 3) ou sans amorce P₀ (piste 4).

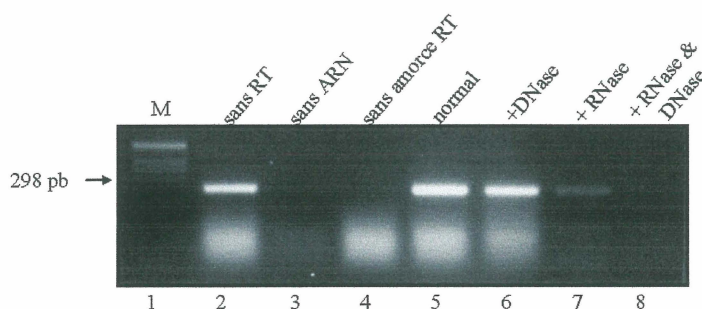


Figure 18 : RT-PCR effectuée sur l'ARN extrait d'un extrait de protéines S-100 à titre de contrôle.

10µl de produits de RT-PCR ont été déposés et analysés sur gel 2% agarose-TAE coloré au bromure d'éthidium. Le marqueur 1Kb Ladder a été déposé dans la piste 1. Les autres pistes sont les produits obtenus après PCR sur des transcriptions inverses dans différentes conditions. Piste 2 : RT sans transcriptase inverse; piste 3 : RT sans ARN; piste 4 : RT sans amorce P₀; piste 5 : réaction complète; piste 6 : ARN traité à la DNase avant RT; piste 7 : ARN traité à la RNase avant RT; piste 8 : ARN traité à la DNase et RNase avant RT.

Ce résultat démontre qu'il y a de l'ADN contaminant dans les réactions de PCR puisqu'une bande apparaît dans le contrôle sans RT (piste 2). De plus, un produit apparaît dans la piste 7 où l'échantillon a été traité à la RNase avant la réaction de transcription inverse. Ces résultats sont possibles seulement si l'amorce utilisée dans la transcription inverse est toujours présente dans la réaction de PCR ensuite. Et effectivement, aucun produit n'apparaît lorsque la réaction de RT-PCR se fait sans l'amorce P₀ (piste 4). Les réactions de RT ont donc été purifiées sur colonne afin

d'enlever l'amorce P_0 ainsi que les nucléotides restants dans la réaction pour ainsi purifier l'ADNc. Les résultats obtenus suite à la purification des produits de RT avant le PCR sont illustrés à la figure 19. Il est clair que la purification sur les colonnes de PCR Clean Up est essentielle avant de faire le PCR. Les pistes où les contrôles sans RT (piste 1), sans ARN (piste 2), sans amorce RT (piste 3) et + RNase (piste 6) sont déposées n'ont aucun produit de RT-PCR, ce qui indique que la purification sur colonne a enlevé l'amorce de RT (P_0), que l'ADN contaminant n'est plus amplifié et que les produits obtenus dans les pistes 4 et 5 sont spécifiques à la réaction.

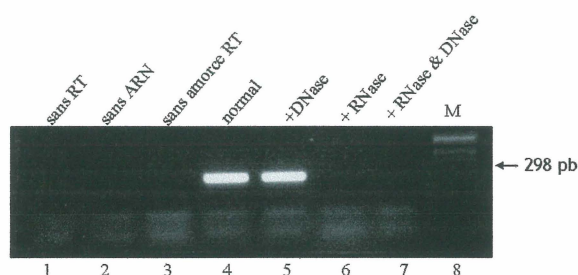


Figure 19 : RT-PCR contrôle où les produits de la réaction de RT ont été purifiés sur colonne avant la réaction de PCR.

10µl de produits de RT-PCR ont été déposés et analysés sur gel 2% agarose-TAE coloré au bromure d'éthidium. Le marqueur 1Kb Ladder a été déposé dans la piste 8. Les autres pistes sont les produits obtenus après PCR sur différentes transcriptions inverses purifiées sur colonne. Piste 1: RT sans transcriptase inverse; piste 2: RT sans ARN; piste 3: RT sans amorce P_0 ; piste 4: réaction complète; piste 5: ARN traité à la DNase avant RT; piste 6: ARN traité à la RNase avant RT; piste 7: ARN traité à la DNase et RNase avant RT.

Les contrôles ayant été effectués, l'ARN extrait des différentes fractions obtenues lors de la purification sur colonne DEAE a été utilisé pour les réactions de RT-PCR. L'ARN des fractions importantes a été extrait et des réactions de RT-PCR ont été effectuées afin de détecter la présence (ou l'absence) de *TLC1* dans ces fractions. Puisque la protéine Est2p (ProA-Est2p) est présente dans les fractions, la présence de la portion ARN de l'holoenzyme de la télomérase nous indiquera qu'il

sera possible d'obtenir une activité *in vitro* à partir des fractions DEAE, à condition bien sûr que l'activité enzymatique de Est2p soit conservée pendant la purification.

Les réactions RT-PCR ont donc été effectuées de différentes façons, toujours en incluant des contrôles de spécificité et de dépendance à l'ARN. À la figure 20A, les réactions ont été effectuées en absence d'ARN et l'absence de produits finaux indiquent que les réactifs utilisés ne contiennent pas d'ADN contaminant pouvant servir à l'amplification lors du PCR. En B de la figure 20, l'ARN ajouté a été traité à la RNase avant la réaction de RT, toujours dans le but de démontrer qu'il y a absence de produits non-spécifiques. À noter que tous les échantillons d'ARN sont traités à la DNase lors de l'extraction. Les parties C à E de la figure 20 illustrent trois essais indépendants effectués sur de l'ARN extrait de fractions provenant de trois purifications différentes. Les résultats sont très variables d'un essai à l'autre. Au départ, *TLC1* se trouve bel et bien dans l'extrait total qui est appliqué sur la colonne. Ensuite, une certaine quantité de *TLC1* se retrouve également dans la fraction non-liée (le *flowthrough*), ce qui indique que la colonne est peut-être saturée lors de l'injection de l'échantillon. Il est impossible de déterminer la quantité exacte qui se retrouve dans la fraction non-liée puisque les essais de RT-PCR ne sont pas quantitatifs. Dans tous les essais, *TLC1* a pu être amplifié dans l'élution finale à 900 mM NaOAc, ce qui est attendu puisque c'est à cette concentration de sels que la télomérase devrait être éluée en plus grande partie (Lue et Peng, 1998; Lue et Xia, 1998). Par contre, une très faible quantité de *TLC1* se retrouve dans le lavage à 300 mM NaOAc. Les éluions faites avec 550 mM NaOAc donnent des résultats variables: *TLC1* a pu être amplifié dans 2

essais sur 3. Ces résultats indiquent que la purification partielle de la télomérase à l'aide de la colonne DEAE permet de purifier la portion ARN de l'holoenzyme, *TLC1*, ainsi que la sous-unité catalytique, Est2p, mais la purification n'est pas très efficace car il y a beaucoup de pertes aux différentes étapes de purification (lavages à 300 et 550 mM NaOAc).

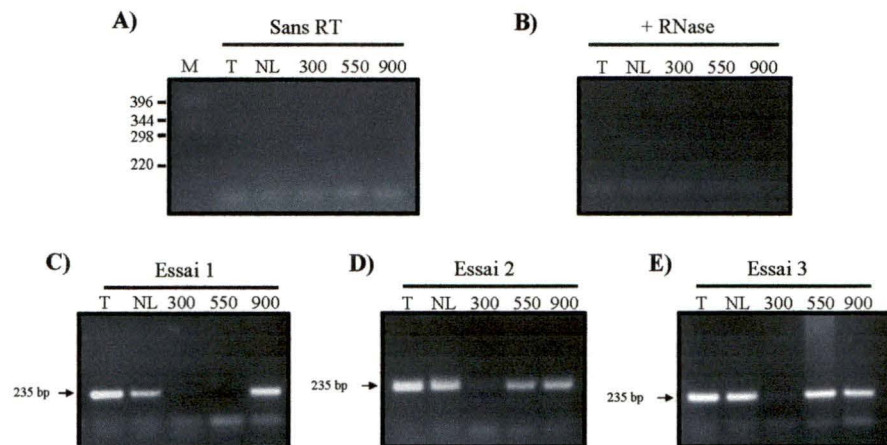


Figure 20 : Réactions de RT-PCR effectuées sur l'ARN extrait des fractions obtenues lors de la purification sur colonne DEAE.

10 µl de produits de RT-PCR ont été déposés et analysés sur gel 2% agarose-TAE coloré au bromure d'éthidium. Les pistes sont identifiées comme suit : T = total (*input*), NL = non-lié (*flowthrough*), 300 = 300 mM NaOAc, 550 = 550 mM NaOAc, 900 = 900 mM NaOAc. La taille du produit est indiquée à gauche. Le panneau A représente les résultats obtenus lorsque les réactions sont effectuées sans transcriptase inverse. Le panneau B représente les résultats obtenus lorsque l'ARN est traité à la RNase avant la réaction de RT. Les panneaux C, D et E représentent les résultats de trois essais indépendants.

Les résultats obtenus lors de l'immunobuvardage de type Western ainsi que du RT-PCR indiquent que la purification de la télomérase sur une colonne de DEAE fonctionne mais qu'il y a des pertes de ProA-Est2p et de *TLC1* lors des lavages. Par contre, la présence de ProA-Est2p et de *TLC1* dans la fraction à 900 mM NaOAc indique que tous les éléments nécessaires à l'activité *in vitro* sont présents, il reste à vérifier qu'il y ait de l'activité enzymatique après la purification.

Des essais d'activité de télomérase *in vitro* ont donc été effectués afin de déterminer si l'activité enzymatique est toujours présente suite à la purification sur colonne DEAE. Les réactions d'activité de télomérase ont dû être ajustées afin d'avoir les bonnes quantités de réactifs pour le volume de fraction utilisé (voir section Matériel et Méthodes). Le résultat de l'essai d'activité de télomérase *in vitro* sur les différentes étapes de purification est illustré à la figure 21. Le résultat obtenu est assez surprenant étant donné que, contrairement à chez l'humain, la télomérase chez *Saccharomyces cerevisiae* n'est pas processive *in vitro*. Les produits d'extension obtenus sont plus longs que les 7 nucléotides normalement ajoutés par la télomérase (contrôle IP, piste 2). L'activité est ARN-dépendante puisque les pistes où l'ARN a été traité à la RNase ne démontrent aucun produit d'extension (Fig. 21, pistes impaires). De plus, l'activité obtenue se retrouve dans les pistes des fractions où ProA-Est2p et *TLC1* ont été retrouvés (pistes 10 et 12) par RT-PCR et immunobuvardage de type Western.

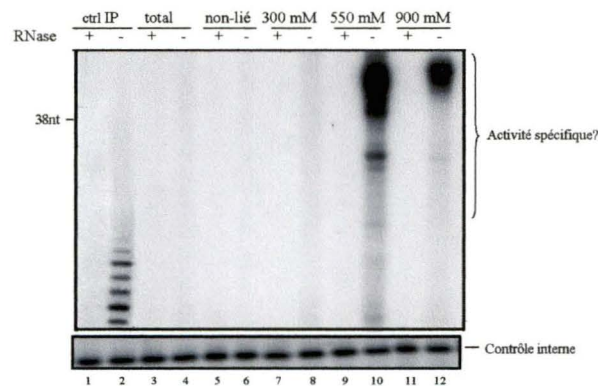


Figure 21 : Essai d'activité de télomérase *in vitro* effectué sur les fractions de protéines obtenues lors de la purification sur colonne DEAE.

La télomérase est partiellement purifiée sur une colonne de DEAE et une extension d'amorce télomérique est effectuée. Les produits sont ensuite analysés sur gel 20% polyacrylamide/8M urée et visualisés sur film BioMax MR (Kodak, Rochester, NY). Les pistes impaires contiennent les échantillons traités à la RNase. Les pistes 1 et 2 représentent des contrôles positifs de réaction effectuée sur des IP d'extrait protéique d'une souche de type sauvage. Un contrôle interne, un oligonucléotide d'une longueur de 12 bases, radiomarké en 5', a été chargé dans chaque échantillon pour s'assurer que la quantité était égale dans chaque piste.

Afin de déterminer si l'activité obtenue à la figure 21 est spécifique à la télomérase, un essai d'activité *in vitro* a été effectué en variant les conditions de la réaction. Premièrement, il était important de vérifier si l'activité est dépendante de la présence de l'oligonucléotide télomérique. Cet essai est présenté à la figure 21A. Encore une fois, des contrôles où les réactions ont été traitées à la RNase sont inclus afin de s'assurer que l'activité obtenue est ARN-dépendante (pistes 1 et 4). Les réactions dans les pistes 2 et 5 sont les réactions contrôles. Aux pistes 3 et 6, les réactions ont été effectuées sans l'oligonucléotide télomérique NLTAG1-3. L'activité obtenue semble diminuer lorsque l'oligo NLTAG1-3 est absent, mais elle ne disparaît pas complètement tel qu'attendu si l'activité est réellement spécifique à la télomérase. L'activité oligo-indépendante, si elle provient réellement de la télomérase, pourrait être possible si une certaine quantité de fragments d'ADN télomérique sont présents dans les fractions, ce qui pourrait être le cas puisque les fractions ne sont pas purifiées pour enlever l'ADN. Le panneau B de la figure 22 présente les résultats obtenus lorsque les réactions d'activité de télomérase sont effectuées en variant les déoxynucléotides présents. La télomérase de la levure ajoute uniquement des déoxyguanosine 5'-triphosphates (dGTP) et des déoxythymidine 5'-triphosphate (TTP) en suivant la matrice dictée par l'ARN *TLC1*. En principe, la réaction d'activité de télomérase nécessite seulement la présence de dGTP et TTP mais, lors des réactions normales, tous les nucléotides sont tout de même présents. En omettant le dGTP et/ou le TTP, l'activité dépendante de la télomérase devrait donc être inhibée puisque les nucléotides requis pour l'extension sont absents. D'autres réactions ont également été faites en omettant les autres nucléotides non requis par la télomérase. Les résultats de

ces différentes réactions sont représentés à la figure 22B. La portion gauche du gel représente les réactions faites sur la fraction à 550 mM NaOAc et la portion droite du gel représente les réactions faites sur la fraction à 900 mM NaOAc. Les contrôles négatifs (réactions traitées à la RNase) se trouvent dans les pistes 2 et 9 et il n'y a pas d'activité. Les contrôles positifs sont dans les pistes 3 et 10 (réactions normales sur fractions DEAE 550 mM et 900 mM acétate de sodium). Ensuite, différentes combinaisons de déoxynucléotides ont été utilisées lors des réactions. Aux pistes 4 et 11, seulement du dGTP radiomarqué (dGTP*) a été incorporé. Un bon signal d'activité est visible dans la fraction à 550 mM NaOAc et un peu moins visible dans la fraction à 900 mM NaOAc. Aux pistes 5 et 12, les déoxynucléotides présents sont dGTP* et TTP, donc les nucléotides requis pour une activité de télomérase. En effet, une activité est observée dans les deux fractions. Les pistes 6 et 13 contiennent les réactions faites avec du dGTP* et du dATP et, encore une fois, une activité peut être observée dans chaque fraction. Même chose aux pistes 7 et 14, la combinaison de dGTP* et de dCTP permet d'observer une activité dans les fractions. Finalement, seulement du dGTP froid (non-radiomarqué) a été incorporé dans les réactions aux pistes 8 et 15 mais, en plus, l'oligonucléotide télomérique NLTAG1-3 utilisé pour ces deux réactions a été radiomarqué en 5'. Aucune activité ne peut être observée mais il est possible d'observer qu'il y a dégradation de l'oligonucléotide télomérique au bas du gel. Ceci pourrait indiquer qu'il y a de l'activité DNase dans les fractions et qu'elle peut être la cause de l'absence d'activité de télomérase dans celles-ci.

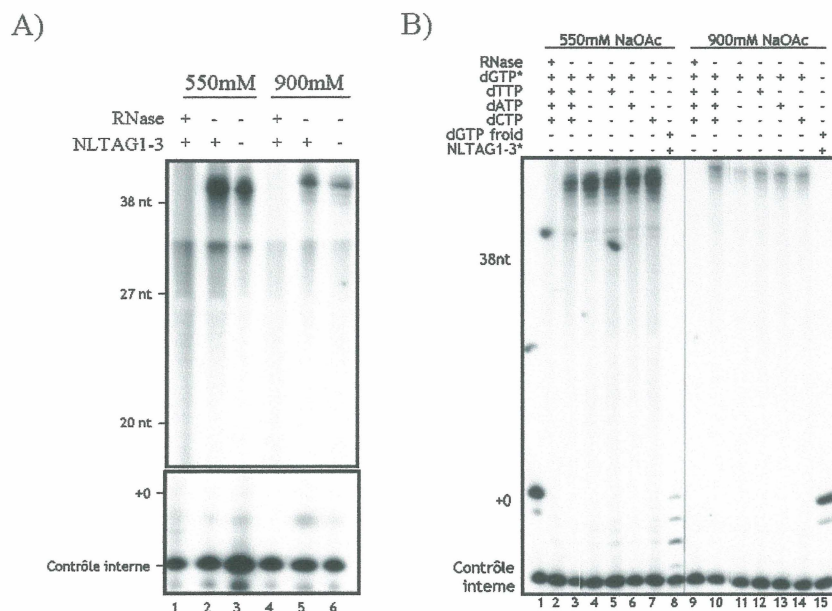


Figure 22 : Essais d'activité de télomérase *in vitro* effectués en variant les conditions de réactions. La télomérase est partiellement purifiée sur une colonne de DEAE et une extension d'amorce télomérique est effectuée. Les produits sont ensuite analysés sur gel 20% polyacrylamide/8M urée et visualisés sur film BioMax MR. Contrôle interne = oligonucléotide de 12 bases de longueur radiomarqué en 5'. A) Vérification de la dépendance de l'activité à la présence de l'oligo télomérique. Pistes 1 et 4 = traitement RNase; pistes 2 et 5 = réactions normales; pistes 3 et 6 = réactions sans oligo télomérique. Des oligonucléotides de différentes tailles ont également été marqués en 5' et déposés sur le gel afin d'évaluer les tailles obtenues (les tailles sont indiquées à gauche du gel). B) Essai d'activité de télomérase effectué en utilisant différentes combinaisons de déoxynucléotides. Piste 1 = marqueur « +0 » (point de départ, oligonucléotide de 16 bases de longueur radiomarqué en 5'). Piste 2 et 9 = contrôles négatifs, réactions traitées à la RNase; pistes 3 et 10 = contrôles positifs, réactions normales; pistes 4 et 11 = [α - 32 P] dGTP (dGTP*) seul; pistes 5 et 12 = dGTP* + TTP; pistes 6 et 13 = dGTP* + dATP; pistes 7 et 14 = dGTP + dCTP; pistes 8 et 15 = dGTP froid + NLTAG1-3*.

Les résultats obtenus à la figure 22 indiquent que l'activité observée dans les fractions DEAE (élutions à 550 et 900 mM NaOAc) n'est pas spécifique à la télomérase puisque, si cette activité était télomérase-dépendante, le simple fait d'omettre le TTP dans la réaction ferait en sorte que l'activité disparaîtrait. Par contre, il est toujours possible que, dans la réaction où le TTP a été omis, des nucléotides libres ont co-purifiés avec les protéines dans les fractions lors de la purification. Le

cas échéant, il nous serait donc impossible, seulement par l'omission du TTP, de conclure si l'activité est télomérase-dépendante.

Un aspect de la purification qui peut détruire l'activité de télomérase est l'utilisation de concentrations de sels croissantes lors des éluions. Les fractions n'étant pas dialysées avant les essais enzymatiques, il est fort probable que l'activité de la télomérase est inhibée par ces quantités de sel. Pour déterminer si tel est le cas, des essais d'activité *in vitro* ont été effectués à l'aide des immunoprécipitations de ProA-Est2p + *TLC1* puisque l'activité de télomérase est visible dans ceux-ci. Le test effectué est représenté à la figure 23. Les réactions ont été faites dans différentes concentrations de acétate de sodium, reproduisant ainsi les étapes de purification sur colonne DEAE. Le marqueur +0, point de départ de l'extension par la télomérase, a été déposé dans la piste 1 (oligonucléotides de 16 bases radiomarké en 5'). Toutes les pistes contiennent un contrôle interne de chargement (oligonucléotides de 12 bases radiomarké en 5'). À la piste 2, la réaction a été traitée à la RNase à titre de contrôle négatif. La piste 3 contient le contrôle positif (réaction normale). Finalement, les pistes 4, 5 et 6 contiennent les réactions faites en présence de 300, 550 et 900 mM NaOAc respectivement. Même en présence de 300 mM acétate de sodium, l'activité de télomérase est complètement inhibée. Ce résultat indique que les fractions DEAE doivent être dialysées avant d'effectuer les tests enzymatiques.

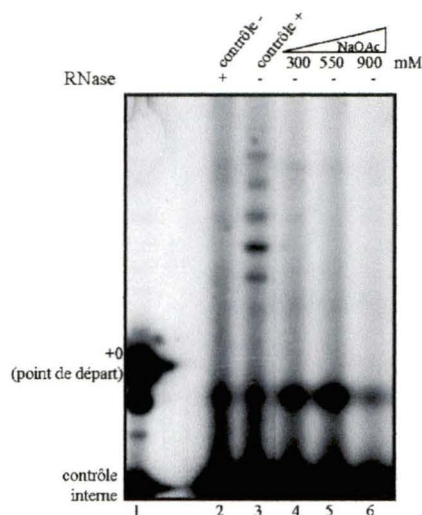


Figure 23 : Tests d'activité de télomérase sur immunoprécipitations faits en présence des différentes concentrations de sel utilisé lors de la purification DEAE.

La télomérase est partiellement purifiée à l'aide de billes IgG sépharose et une extension d'amorce télomérique est effectuée à l'aide de $[\alpha\text{-P}^{32}]$ dGTP et les échantillons sont analysés sur gel 20% polyacrylamide/8M urée. Les produits sont finalement visualisés sur film Kodak BioMax. Piste 1 : « +0 », point de départ; piste 2 : réaction traitée à la RNase; piste 3 : réaction normale; pistes 4, 5 et 6 : réactions en présence de 300, 550 et 900 mM NaOAc respectivement. Contrôle interne : 1 μl d'oligonucléotides de 12 bases radiomarqué en 5' (3000 cpm/ μl).

Les fractions ont donc été dialysées contre du tampon TMG + 150 mM NaCl.

Dans le but d'augmenter les chances de voir de l'activité enzymatique dans les fractions dialysées, des immunoprécipitations à l'aide de billes IgG sépharose ont été effectuées sur celles-ci et le résultat est présenté à la figure 24. Un contrôle interne (oligonucléotide de 12 bases marqué en 5') a été inclus dans chaque échantillon. Les pistes 1 et 14 contiennent également le marqueur « +0 », soit le point de départ pour l'extension de l'oligo télomérique. Les réactions contrôles traitées à la RNase sont représentées dans les pistes paires (excepté la piste 14). Un contrôle positif est chargé dans la piste 3 afin de s'assurer que les réactions fonctionnent bien. Dans la piste 5, une IP a été faite sur l'extrait total tel qu'il est chargé sur la colonne DEAE et il y a bel et bien de l'activité de télomérase au départ de la purification DEAE. Ensuite, dans la piste 7, la réaction a été faite sur la fraction non-liée de la purification DEAE

et il y a également un peu d'activité. Ceci est attendu puisque ProA-Est2p et *TLC1* y sont présents. Par contre, aucune activité n'est présente dans les autres fractions (pistes 9, 11 et 13) ce qui indique que soit les fractions sont trop diluées en protéines pour voir de l'activité, ou soit qu'il y a perte d'activité suite aux différentes étapes de purification.

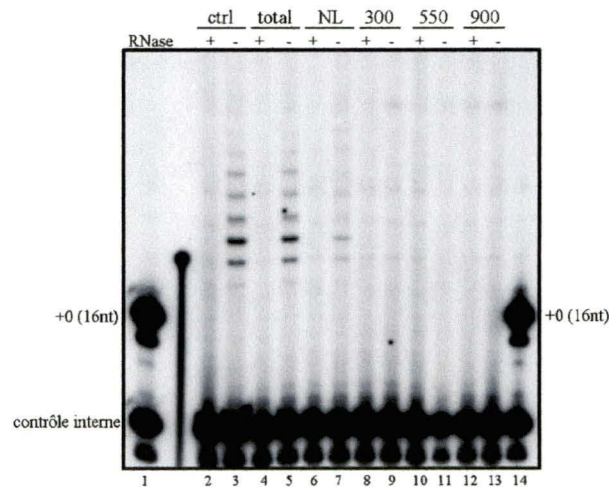


Figure 24 : Essai d'activité de télomérase sur immunoprécipitations de fractions DEAE dialysées. La télomérase est partiellement purifiée sur une colonne de DEAE, dialysée contre du TMG + 150 mM NaCl, immunoprécipitée à l'aide de billes IgG sépharose et une extension d'amorce télomérique est effectuée. Les produits sont ensuite analysés sur gel 20% polyacrylamide/8M urée et visualisés sur film BioMax MR. Contrôle interne = oligonucléotide de 12 bases de longueur radiomarké en 5'. Pistes 1 et 14 : marqueur +0. Pistes paires : réactions traitées à la RNase. Piste 3 : contrôle positif; piste 5 : extrait total; piste 7 : non-lié; pistes 9, 11 et 13 : réactions faites sur fractions à 300, 550 et 900 mM NaOAc respectivement.

Afin d'enrayer la possibilité que les fractions sont trop diluées pour y avoir de l'activité de télomérase, des essais enzymatiques ont été effectués sur des immunoprécipitations faites sur les fractions DEAE diluées à la plus basse concentration de protéines, soit celle de la fraction 900 mM NaOAc. Le raisonnement est que, s'il est impossible de voir de l'activité de télomérase dans cette fraction, même immunoprécipitée, il sera impossible de voir de l'activité de télomérase dans les fractions DEAE. Le résultat, plutôt concluant, est illustré à la figure 25. Le

marqueur +0 a été déposé dans les pistes 1 et 14. Le contrôle positif où l'extrait total n'a pas été dilué avant l'immunoprécipitation a été déposé dans la piste 3 et on voit qu'il y a de l'activité de télomérase. Les pistes paires contiennent les réactions traitées à la RNase. En résumé, le résultat indique que les fractions DEAE utilisées pour les tests d'activité de télomérase sont trop diluées pour y détecter une activité. En effet, la piste 5 représente l'échantillon d'extrait total dilué à la concentration de protéines de la fraction la plus diluée, soit celle à 900 mM NaOAc. Dans cet échantillon, il est clair qu'il n'y a pas d'activité visible même malgré l'immunoprécipitation.

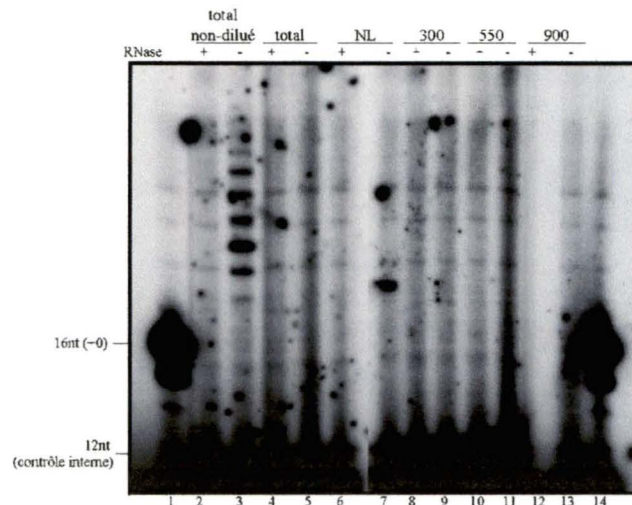


Figure 25 : Essai d'activité de télomérase effectué sur des immunoprécipitations des fractions diluées jusqu'à la plus basse concentration de protéines.

La télomérase est partiellement purifiée sur une colonne de DEAE, dialysée contre du TMG + 150 mM NaCl. Les échantillons sont dilués et immunoprécipités à l'aide de billes IgG sépharose et une extension d'amorce télomérique est effectuée. Les produits sont ensuite analysés sur gel 20% polyacrylamide/8M urée et visualisés sur film BioMax MR. Contrôle interne = oligonucléotide de 12 bases de longueur radiomarké en 5'. Pistes 1 et 14 : marqueur +0. Pistes paires : échantillons traités à la RNase. Pistes 2 et 3: extrait total non-dilué; pistes 4 et 5 : extrait total dilué; pistes 6 et 7 : partie non-liée; pistes 8 et 9 : fractions à 300 mM NaOAc; pistes 10 et 11 : fractions à 550 mM NaOAc; pistes 12 et 13: fractions à 900 mM NaOAc.

Nous pouvons donc conclure que la purification sur colonne DEAE peut purifier la protéine Est2p et la partie ARN de la télomérase, *TLC1*, mais que les fractions sont trop diluées pour détecter une activité de l'enzyme *in vitro*. À ce stade, le projet a été arrêté. Par contre, une étape où les protéines sont concentrées ainsi que l'utilisation d'une plus grande quantité de cellules pourraient être envisagées. C'est probablement ce point qui différencie notre purification de celle des groupes ayant fait la purification partielle de la télomérase : le volume de culture initial. Étant donné la faible abondance de la télomérase dans une cellule de *Saccharomyces cerevisiae* (Mozdy et Cech, 2006), l'augmentation du volume de culture initial serait, selon moi, une bonne façon d'augmenter la quantité de protéine purifiée et ainsi détecter de l'activité enzymatique dans la fraction à 900 mM NaOAc.

CHAPITRE III

Purification de certains peptides dérivés des sous-unités de la télomérase dans le but de générer des anticorps.

Préambule

L'étude de l'holoenzyme de la télomérase rentre dans une phase de plus en plus mécanistique. Les différents groupes qui y travaillent utilisent des versions étiquetées des protéines formant le complexe. Ces étiquettes servent à analyser les protéines par immunobuvardage de type Western ainsi qu'à démontrer les interactions protéine-protéine, dans le complexe, via des co-immunoprécipitations. Étant donné qu'aucun groupe ne peut travailler avec des versions natives des protéines formant le complexe de la télomérase chez la levure, les études biochimiques sont difficiles et peuvent être biaisées par la présence de ces étiquettes. Il est donc primordial que des anticorps soient produits contre les différentes protéines de la télomérase afin de les étudier dans leurs versions natives. Ces anticorps pourront également servir à analyser les rapports stœchiométriques entre les différents membres du complexe. Ce projet a donc pour but de purifier les sous-unités de la télomérase, entières ou des fragments, via l'utilisation de systèmes d'expression bactériens. Pour mettre au point la technique, un fragment de la protéine Est1p a été cloné, exprimé en bactérie et purifié.

III.I MATÉRIEL ET MÉTHODES

Afin de purifier une portion de la protéine Est1p, un fragment d'ADN codant pour environ la moitié de la protéine a été amplifié et cloné dans un vecteur d'expression bactérien, pGEX-4T-3. Ce vecteur permet une très grande expression et production de la protéine de fusion Gst-FrEst1p. La protéine est ensuite purifiée à l'aide de billes de sépharose recouvertes de glutathione. Il est ensuite possible d'enlever l'étiquette GST via un clivage par la protéase Thrombine pour ainsi obtenir le fragment désiré en grande quantité, suffisamment pour produire des anticorps contre cette portion d'Est1p. Seulement une portion d'Est1p a été purifiée pour l'instant à titre de contrôle et pour mettre les conditions au point, mais le but ultime est de purifier les sous-unités de la télomérase et de produire des anticorps contre celles-ci afin de faciliter l'étude de la télomérase chez *Saccharomyces cerevisiae*. Un schéma de la purification via l'utilisation de l'étiquette GST est présenté à la figure 26.

TECHNIQUES DE CLONAGE

Les manipulations d'ADN (digestion avec enzymes de restriction, ligation, déphosphorylation, purification de fragments, etc.) ont été effectuées telles que décrites par Sambrook et al. (Sambrook *et al.*, 1989) ou selon le protocole fourni par les compagnies fournissant le matériel utilisé. Les enzymes de restriction utilisées proviennent des compagnies suivantes : GE Healthcare (Baie d'Urfé, QC, Canada) et

NEB (Pickering, ON, Canada). Aux réactions de digestion effectuées dans les tampons fournis par les compagnies, 0.1mg/mL de RNase A est ajouté afin d'enrayer toute trace d'ARN. Certaines digestions où plusieurs enzymes de restriction sont nécessaires ont été faites avec un tampon universel nommé « Magic Buffer » (10X Magic Buffer : 0.2M Tris pH 7.2, 0.7M NaCl, 0.2M KCl, 0.1M MgCl₂, 0.5 mM Spermine, 0.125 mM Spermidine, 0.1% v/v Aprotinine). Aux réactions effectuées dans le Magic Buffer, 0.01M DTT, 0.1% m/v Digitonine et 0.1mg/mL RNase A ont été ajoutés.

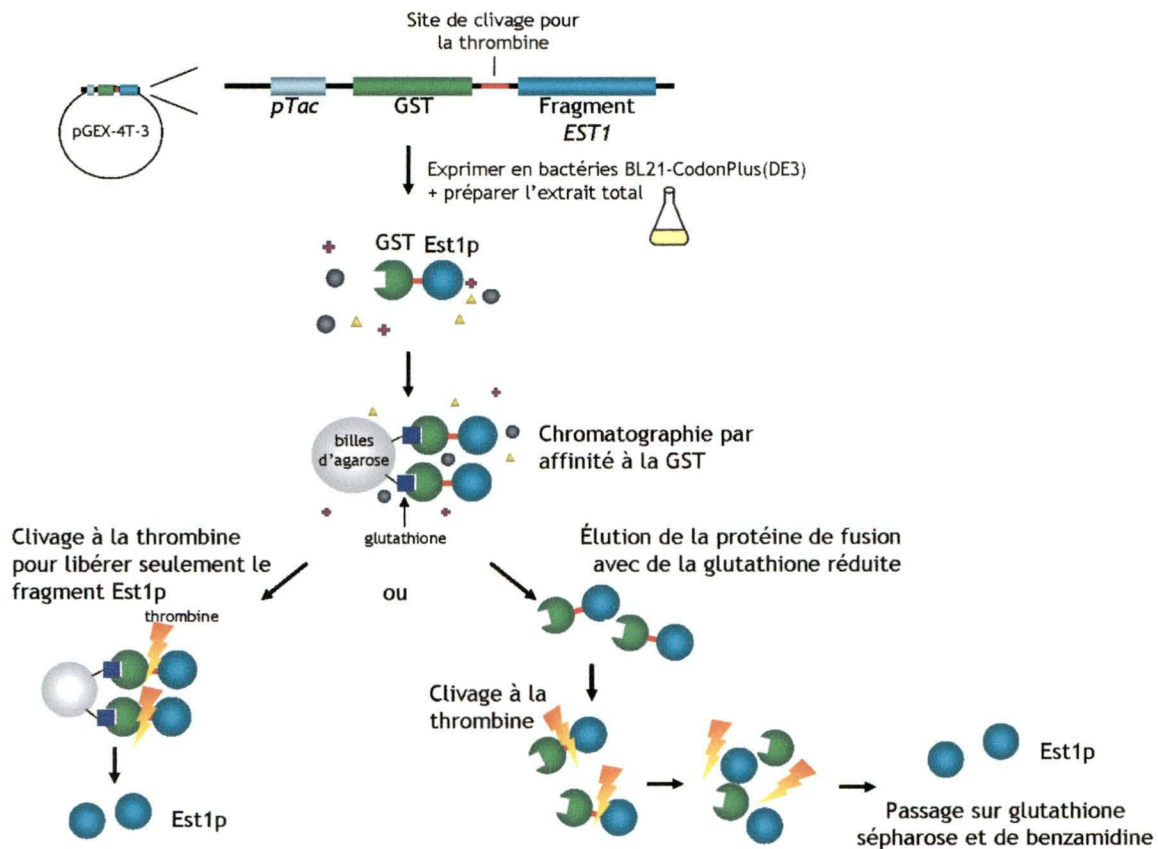


Figure 26 : Schéma représentant les étapes de purification de Gst-FrEst1p.

PLASMIDES

Constructions

Afin d'exprimer les protéines en bactéries, les vecteurs pQE80L (hexamères d'histidine) et pGEX-4T-3 (étiquette GST) ont été utilisés. Le vecteur pQE80L provient de la compagnie Qiagen (Mississauga, ON, Canada) et le vecteur pGEX-4T-3 provient de la compagnie GE Healthcare (Baie d'Urfé, Qc, Canada). Le vecteur pQE80L contient le nécessaire pour l'expression d'une étiquette d'hexamère d'histidine (6xHis) en N-terminal de la protéine à purifier. Pour des raisons pratiques, la description des étapes de clonage, essais d'expression et de purification effectuées avec le vecteur pQE80L (afin d'exprimer 6×His-Est1p) a été omis puisque cette partie du projet n'a pas fonctionné. Les résultats obtenus indiquaient que la protéine de fusion obtenue était insoluble. Enfin, seulement un fragment de la protéine Est1p a été cloné dans le vecteur pGEX-4T-3 puisque nous voulions nous assurer de la solubilité de la protéine finale. Un fragment plus petit augmente souvent la solubilité des protéines de fusion et aide ainsi à la purification en conditions natives. Le fragment choisi comprend les acides aminés 507 à 699 (paires de base 1521 à 2097 du gène *EST1*) correspondant à environ la moitié de la protéine. Ce fragment est considéré immunogénique selon le programme PepTool 2.0 (BioTools incorporated, Alberta, Canada).

Suite aux digestions des plasmides avec les enzymes de restriction BamHI et XhoI, des réactions de déphosphorylation ont été effectuées à l'aide de la phosphatase

alcaline de crevettes (Roche, Laval, Québec) en suivant le protocole fourni par la compagnie. La déphosphorylation du plasmide d'accueil était nécessaire pour les ligations subséquentes du fragment d'ADN codant pour une partie de la protéine Est1p.

Dans le but de faciliter le clonage dans le plasmide pGEX-4T-3, le fragment d'ADN a été sous-cloné dans le vecteur pRS306. Étant donné qu'il est souvent difficile de digérer complètement l'ADN lorsque les sites de restriction sont aux extrémités, l'étape de sous-clonage assure une bonne digestion du fragment hors du pRS306 et le fragment obtenu peut facilement être ligué dans le vecteur pGEX-4T-3 digéré avec les mêmes enzymes de restriction que le fragment. Ceci assure donc que les fragments d'ADN n'ont pas été partiellement digérés et permet un meilleur rendement lors de la ligation.

Pour amplifier le fragment du gène *EST1* et de le sous-cloner dans le vecteur pRS306 (pour ensuite le digérer et le liguer dans pGEX-4T-3), l'ADN génomique d'une souche de levure de type sauvage fut utilisé à titre de matrice dans les réactions de PCR. Les amorces utilisées sont GST-EST1 FRAG Bam-FO (5'- CGG GAT CCA ACT TTG CAC TAA GAC ATT TT – 3') et GST-EST1 FRAG Xho-REV (5'- CCG CTC GAG TCA AGT AGG AGT ATC TGG CAC - 3'). Les amorces ont été synthétisées par la compagnie IDT DNA (Coralville, IA). L'ADN polymérase Vent de NEB (Pickering, ON, Canada) a été utilisée puisque cette enzyme possède une activité « proofreading » permettant ainsi de limiter les mutations causées lors de la

polymérisation. Les réactions de PCR sont composées de : 100 ng d'ADN génomique, 1X tampon Thermopol, 0.4 mM de chaque dNTP, 13pmol de chaque amorce et 1 unité de Vent_R DNA polymerase (selon les instructions de la compagnie). Le PCR consiste en une étape initiale de dénaturation pendant 5 minutes à 96°C. Ensuite, les 3 étapes suivantes se répètent 30 fois: 1 minute à 94°C (dénaturation), 1 minute à 60°C (appariement) et 1 minute à 72°C (polymérisation). Une extension finale est effectuée pendant 5 minutes à 72°C. La taille du fragment attendu est d'environ 580 pb. Les produits de PCR sont ensuite analysés sur un gel de 1.5% m/v agarose-TAE puis les bandes correspondantes au fragment *EST1* sont découpées du gel et purifiées sur les colonnes d'extraction d'ADN sur gel de Qiagen (Pickering, ON, Canada). Il faut noter que les amorces utilisées permettent d'amplifier un fragment de *EST1* tout en ajoutant des sites de restriction pour les enzymes BamHI et XhoI à chaque extrémité du fragment. Une fois le fragment purifié, celui-ci est digéré avec BamHI et XhoI et purifié à nouveau sur gel.

Ensuite, des ligations sont effectuées à l'aide de la T4 DNA ligase de NEB (Pickering, ON, Canada). Après la ligation des fragments dans le plasmide pRS306 (digéré BamHI et XhoI), des bactéries chimiocompétentes *Escherichia coli* DH5α sont transformées afin d'amplifier le plasmide contenant le fragment *EST1*. Les transformations ont été effectuées selon la méthode décrite dans Sambrook et al. (Sambrook *et al.*, 1989). La croissance des bactéries se fait dans du milieu LB (1% m/v Bacto-tryptone, 1% m/v NaCl, 0.5% m/v extrait de levure) contenant 1 µg/mL d'ampicilline.

Minipréparation d'ADN plasmidique

Une fois en bactérie, le plasmide contenant le fragment d'ADN codant pour une portion de la protéine Est1p a été isolée des bactéries selon le protocole standard de minipréparation d'ADN décrit dans Sambrook et al. (Sambrook *et al.*, 1989). L'ensemble pour miniprep de la compagnie Qiagen (Mississauga, ON, Canada) a été utilisé lorsque les échantillons d'ADN plasmidiques ont dû être séquencés. Une fois que les mini-preps sont effectuées, les différents clones sont analysés afin de déterminer si l'insertion du fragment d'*EST1* s'est bien effectuée. Un PCR a donc été fait sur une certaine quantité de colonies de bactéries afin de détecter la présence (ou l'absence) de l'insert. Des amorces universelles présentes dans pRS306 (de chaque côté de l'insert) ont été utilisées et les produits de PCR ont été analysés sur gel d'agarose.

Clonage dans pGEX-4T-3

Après identification des clones, les plasmides positifs pour la présence de l'insert ont été digérés avec les enzymes BamHI et XhoI et le fragment excisé a été cloné dans le vecteur d'expression pGEX-4T-3 (digéré avec BamHI et XhoI puis déphosphorylé). Suite à la ligation, transformation dans les bactéries DH5 α , minipréparation d'ADN et identification des clones ayant l'insert par PCR (amorces : pGEX 5' seq. Primer et pGEX 3' seq. Primer), l'orientation de l'insert a été identifiée à l'aide de digestions par des enzymes de restriction coupant une fois dans l'insert et

une fois dans le vecteur pGEX-4T-3. Ceci étant fait, les clones positifs ont été envoyés au séquençage afin de s'assurer que la polymérisation par PCR n'a pas entraîné la formation de mutations dans le fragment et que celui-ci est présent dans le bon cadre de lecture pour la production de la protéine de fusion Gst-FrEst1p.

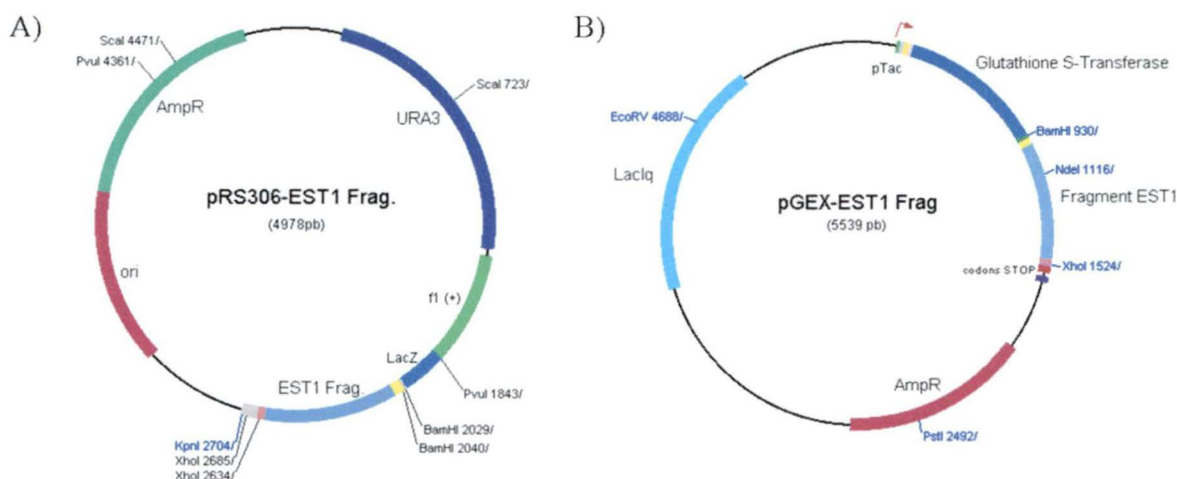


Figure 27 : Constructions plasmidiques

A) pRS306-EST1 frag : fragment du gène *EST1* cloné BamHI+XhoI dans le vecteur pRS306 digéré BamHI+XhoI et déphosphorylé. B) pGEX-EST1 frag : fragment du gène *EST1* excisé du pRS306-EST1 Frag. et cloné dans le vecteur d'expression pGEX-4T-3 digéré BamHI+XhoI. L'insertion s'est effectuée dans le bon cadre de lecture afin d'induire la production de la protéine de fusion Gst-FrEst1p en bactéries.

EXPRESSION DE GST-FrEst1p

Transformation dans les bactéries BL21-CodonPlus (DE3)

Les bactéries chimiocompétentes BL21-CodonPlus (DE3) provenant de la compagnie Stratagene (Cedar Creek, TX) ont plusieurs particularités qui les rendent utiles lors de l'expression de protéines eucaryotes. Afin d'empêcher la dégradation des protéines recombinantes produites, les bactéries n'expriment pas les protéases *Lon*

et *OmpT*. De plus, l'absence de l'endonucléase *endA* empêche la dégradation de l'ADN plasmidique isolé lors de mini-preps. Les bactéries contiennent également des plasmides d'expression d'ARNs de transfert eucaryotes favorisant ainsi la production des protéines provenant de ces organismes. Les cellules sont *DE3*, ce qui veut dire qu'elles expriment la T7 ARN polymérase, donc on doit utiliser un vecteur avec un promoteur pour la T7 ARN polymérase inductible.

Le vecteur pGEX-4T-3 possède le promoteur *Tac* (voir figure 16) qui est un hybride des promoteurs *Trp* et *LacUV5*. Ce promoteur est très fort et contrôle l'expression des inserts clonés. Par contre, il possède une légère expression basale. Cette expression basale peut entraîner de la toxicité et les bactéries pourraient former des corps d'inclusion et rendre la protéine de fusion désirée insoluble. Afin d'y remédier, le plasmide pGEX-4T-3 exprime le gène *LacIⁿ* qui lui encode pour un répresseur de l'opéron *Lac*. Ce répresseur agit en *cis* afin de réprimer le promoteur. L'IPTG (Isopropyl-β-D-Thioalactopyranoside) induit la T7 ARN polymérase via le promoteur *LacUV5*. Lorsque l'IPTG est ajouté, l'opéron *Lac* est activé (le répresseur est déplacé) permettant ainsi l'expression du promoteur et la production de la protéine de fusion.

Afin d'induire l'expression de la protéine Gst-FrEst1p dans les bactéries BL21-CodonPlus (que je nommerai BL21+ à partir de maintenant) chimiocompétentes, le plasmide pGEX-EST1 FRAG a été transformé suivant la méthode décrite dans Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.*, 1989) et la croissance

sélectionnée sur milieu LB+KASC (K = Kanamycine 25 µg/mL; A = Ampicilline 50 µg/mL; S = Streptomycine 75 µg/mL; C = Chloramphénicol 34µg/mL). Il est à noter que les bactéries BL21+ chimiocompétentes possèdent deux plasmides d'expression des ARNt eucaryotes ainsi que le plasmide pREP4 qui lui encode pour le répresseur *LacI^f* (répression supplémentaire pour s'assurer de l'abolition complète de l'expression basale du promoteur, évitant ainsi que la protéine de fusion provoque de la toxicité).

Induction à l'IPTG

Afin d'induire les bactéries, une colonie est inoculée et incubée 18h à 37°C dans 50mL de 2X-YT (16% m/v Tryptone, 10% m/v Yeast Extract, 5% m/v NaCl) additionné de 25 µg/ml Kanamycine, 50 µg/mL Ampicilline et 50 µg/mL Chloramphénicol. Le lendemain, 1 litre de 2X-YT (+ Kan, Amp et Cam) est inoculé avec 15 mL des cultures poussées à 37°C. Le tout est ensuite incubé à 30°C jusqu'à obtention d'une densité optique à 600nm de 0.5. Lorsque la DO est atteinte, l'induction est effectuée en ajoutant de l'IPTG (poudre) dans la culture. La quantité d'IPTG nécessaire à l'induction a été déterminée préalablement à l'aide de tests d'induction et cette quantité a été fixée à 0.5 mM. L'induction se fait à 30°C (température d'induction également définie lors des tests d'induction) pendant 4h, avec agitation constante.

Préparation de l'extrait total de protéines

Suite à l'induction, les bactéries sont centrifugées à 8500 x g pendant 20 minutes à 4°C. Le culot est ensuite resuspendu dans 15 mL d'eau glacée dans laquelle des inhibiteurs de protéases Complete, mini EDTA-free (Roche, Laval, Québec) ont été ajoutés. Les cellules sont soniquées à une puissance de 50%, 2 fois 4 minutes sur glace, à l'aide de l'appareil Sonic Dismembrator de Artek Corporation (distribué par Fisher Scientific, Ville St-Laurent, Québec). L'extrait est ensuite centrifugé à 8500 x g pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant est mis de côté (sur glace) et le culot est resuspendu dans 5mL d'eau froide (avec inhibiteurs). Le tout est soniqué une autre fois pendant 2 minutes, sur glace, toujours à 50% de puissance et centrifugé pendant à 8500 x g pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant obtenu est ajouté au premier surnageant et une dernière étape de centrifugation est effectuée pendant 45 minutes à 13900 x g, toujours à 4°C. À l'extrait obtenu, 1 volume de PBS 2X + inhibiteurs de protéases est ajouté avant de le filtrer sur un filtre 0.2 µm. L'extrait peut finalement être congelé ou utilisé directement pour la purification de Gst-FrEst1p.

PURIFICATION DE Gst-FrEst1p

Purification sur billes de glutathione

Deux méthodes ont été utilisées dans le but de purifier la protéine de fusion Gst-FrEst1p. Ces deux méthodes sont décrites dans le guide *GST Gene Fusion System*

publié par la compagnie GE Healthcare (Baie d'Urfé, Québec). La première consiste à utiliser de la résine de sépharose recouverte de glutathione directement dans les extraits totaux, technique communément appelée purification « par *batch* ». Cette façon de procéder est utilisée pour faire les différents tests préliminaires de purification : mettre au point les conditions de liaison, le nombre de lavages, la stringence du tampon utilisé, la quantité de glutathione réduite à utiliser lors des éluions ainsi que le nombre total d'éluion (volume).

Purification « par batch »

Le protocole décrit dans le *GST Gene Fusion System Handbook* (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Québec) a été utilisé avec certaines modifications. Pour les tests préliminaires, 1 mL d'extrait total a été utilisé dans le but d'établir les conditions. Également, un plus grand volume d'extrait total a été utilisé en purifiant de cette façon afin de comparer l'efficacité avec la purification sur FPLC. Lorsque de plus grands volumes d'extrait total ont été utilisés, les volumes de tampon et de réactifs ont été ajustés proportionnellement. Donc, à 1 mL d'extrait ajusté à pH 8.0, 300 µl (⅓ volume) de billes de sépharose recouvertes de glutathione (Glutathione Sepharose 4B) ont été ajoutées. Ces billes ont été préalablement lavées 3 fois dans du PBS pH 8.0 (140 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 1.0 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄) et resuspendues dans 1 volume de PBS pH 8.0 (« 50% slurry »). L'extrait + billes est incubé pendant ≥ 4heures à 4°C sur une rôtissoire. Après l'incubation, les billes sont lavées dans 10 volumes de billes de PBS pH 8.0 froid. À noter qu'à chaque étape, un

aliquot est conservé pour analyse sur SDS-PAGE. À partir de cette étape, il y a deux possibilités. Il est possible d'éluer la protéine de fusion complète, de la cliver en solution et de re-purifier sur de la sépharose de glutathione pour enlever la portion Gst. Pour ce faire, 3-4 éluions sont effectuées en appliquant 1 volume de 20 mM L-glutathione réduite (Sigma, Oakville, ONT) diluée dans du PBS pH 8.0. Ces éluions sont faites à 4°C pendant au moins 1 heure chacune. Lorsque les éluions sont complétées, les protéines sont quantifiées à l'aide du test de dosage Bradford (BioRad, Mississauga, ONT). La protéase thrombine de la compagnie GE Healthcare (Baie d'Urfé, Qc) est ensuite ajoutée aux éluions à raison de 10U/mg de protéines. Ce clivage est effectué à 4°C, pendant deux heures et se poursuit durant toute une nuit en même temps qu'une dialyse est effectuée contre du PBS pH 8.0 pour enlever la glutathione réduite. Ainsi, il est possible d'enlever la portion Gst qui est présente dans les éluions clivées en incubant à nouveau les éluions à 1/3 volume de billes de sépharose recouvertes de glutathione, au moins 4 heures à 4°C. Le surnageant est finalement enlevé et les billes sont lavées 2-3 fois dans du PBS puis conservées afin d'analyser l'efficacité d'éluion sur SDS-PAGE.

D'un autre côté, la portion Est1p peut être directement clivée en traitant les billes à la thrombine. Le site de clivage pour la thrombine étant entre Gst et FrEst1p, seulement la protéine FrEst1p sera éluee lors du clivage. Afin de cliver directement sur les billes, celles-ci sont incubées pendant un minimum de 4 heures à 4°C dans du PBS + 10 U/mL de thrombine. Après l'incubation, le surnageant est enlevé et les

billes sont lavées 2-3 fois dans du PBS. Les billes sont conservées pour l'analyse sur SDS-PAGE.

Purification sur colonne GSTrap FF

Deux formats de colonne GSTrap FF ont été utilisés : 1mL et 5mL. Le protocole décrit dans le *GST Gene Fusion System Handbook* a été suivi et l'appareil FPLC ÄKTA Explorer (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Qc) a été utilisé. L'extrait total a été appliqué à un débit de 0.01 mL/min à 4°C afin de faciliter la liaison de Gst à la résine. Les lavages sont effectués à un débit de 0.1 mL/min dans du PBS pH 8.0. Finalement, les deux méthodes d'élution expliquées plus haut (élution du complexe puis clivage en solution ou clivage sur colonne) ont été utilisées. Dans le cas où l'élution du complexe a été effectuée avec 20 mM de glutathione réduite, le débit d'application de la solution d'élution est de 0.1mL/min. Une fois l'élution terminée, le clivage à la thrombine et la dialyse ont été faits tel que décrit plus haut. Par contre, pour le clivage directement sur la colonne, la solution contenant 10 U/mL de thrombine a été appliquée à la main (seringue) sur la colonne et la colonne a été incubée toute la nuit à 4°C. Après le clivage, du PBS pH 8.0 est appliqué sur la colonne afin de faire sortir la solution de thrombine + FrEst1p puis la colonne est lavée avec du PBS pH 8.0. La technique publiée par GE Healthcare suggère d'enlever la thrombine de la préparation finale à l'aide de la Benzamidine Sépharose FF. Cette étape a été essayée mais n'a pas été incluse dans l'expérience finale puisque cette étape diluait trop les échantillons.

Purification sur résines échangeuses d'ion

Afin de séparer les deux protéines, plusieurs tests ont été effectués lors des lavages dans du PBS en incluant les réactifs suivants: 2% v/v Tween-20, 1% m/v SDS, hydrochlorure de guanidine, etc. Étant donné que ces tests n'ont pas donné de bons résultats et que les protéines sont toujours inséparables, la méthode retenue pour séparer les deux protéines est l'utilisation des résines échangeuses d'ion. Les méthodes décrites dans le guide *Ion Exchange Chromatography* ainsi que dans le fascicule fourni avec la résine ou les colonnes, par GE Healthcare, ont été utilisées. De plus, les tentatives de purification présentées ont été faites en mode « batch » puisque le FPLC diluait trop les échantillons. Tout d'abord, les protéines clivées obtenues suite au clivage à la thrombine ont été dialysées contre du tampon requis pour la liaison des protéines aux résines choisies. Ce tampon nommé « binding buffer » est composé de : 50 mM Phosphate Buffer pH 8.0, 50 mM NaCl. Les billes de CM/SP sépharose sont également lavées dans ce tampon afin de les équilibrer. Par contre, un des lavages est effectué dans 50 mM Phosphate Buffer pH 8.0, 1.0 M NaCl afin d'activer la résine. Lorsque la résine est équilibrée, 4mL de protéines clivées et dialysées (pH 8.0) sont incubés avec 500 µl de résine. La façon dont la liaison aux billes est effectuée consiste à incuber les protéines 1.0 mL à la fois sur les 500 µl de billes. Après une heure d'incubation avec rotation, le surnageant (protéines non-liées) est enlevé et un autre millilitre de protéines est ajouté. Ceci est répété jusqu'à ce que 4-5 mL de protéines aient été incubés avec les billes. Après incubation, la résine est centrifugée à 2000 x g pour enlever les protéines non-liées. La résine est ensuite lavée

3 fois dans le tampon de liaison. Pour éluer, un gradient de sel est appliqué, par étape. La première élution s'effectue dans du tampon 50 mM Phosphate buffer pH 8.0 + 300 mM NaCl. Cette étape est effectuée deux fois avec un volume de tampon équivalent au volume de billes (1 mL). Ensuite, deux autres élutions sont effectuées avec du tampon à 50 mM tampon de phosphate à pH 8.0 + 600 mM NaCl. Finalement, deux dernières élutions sont effectuées avec du tampon à 50 mM Phosphate buffer pH 8.0 + 1.0 M NaCl. Les billes sont conservées à la fin pour l'analyse sur SDS-PAGE.

ANALYSE SUR SDS-PAGE 15%

Des quantités égales d'échantillons recueillis aux différentes étapes de purifications sont bouillis dans 10 µl de tampon Laemmli 2X (62.5 mM Tris pH 6.8, 25% v/v glycérol, 2% m/v SDS, 0.01% m/v bleu de bromophénol) pendant 5 minutes à 100°C afin de dénaturer les protéines. Les échantillons de billes sont resuspendus dans 50 µl de tampon Laemmli 2X et 15 µl sont chargés sur le gel. Les élutions peu concentrées sont chargées au maximum, soit 15 µl de différentes concentrations non-équivalentes à celles des autres échantillons. Les échantillons sont analysés par migration sur un gel SDS-PAGE 15% pendant une heure à 200 Volts. Le gel est ensuite coloré dans une solution de bleu de coomassie (0.25% m/v Coomassie Brilliant Blue R-250, 45% v/v méthanol, 10% v/v acide acétique) pendant 30 minutes et décoloré dans la solution décolorante (45% v/v méthanol, 10% v/v acide acétique) en agitant jusqu'à ce que les protéines soient clairement visibles.

III.II RÉSULTATS

Tests d'induction

Afin de déterminer les bonnes conditions pour l'expression de la protéine de fusion G_{ST}-FrEst1p en bactéries, des tests d'induction ont été effectués. Les conditions à mettre au point sont : la température d'induction, la durée et la quantité d'IPTG utilisée. Tel qu'illustré à la figure 28, les conditions optimales déterminées sont les suivantes : 0.5 mM d'IPTG, le tout incubé pendant 4h à 30°C (Figure 19B, piste 5). L'incubation à 37°C semble induire plus de protéines mais les analyses subséquentes (données non montrées) démontrent que la production des protéines à 37°C provoque une accumulation de G_{ST}-FrEst1p dans des corps d'inclusion et la protéine de fusion se retrouve dans le culot, soit dans la partie insoluble.

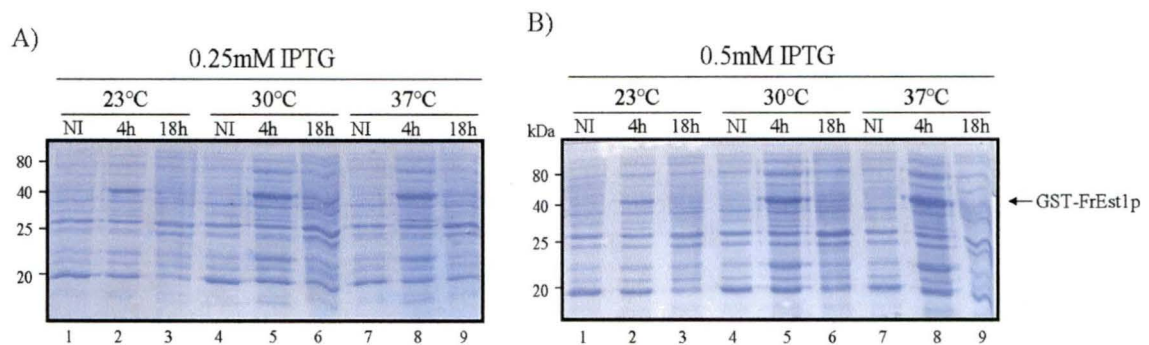


Figure 28 : Tests d'induction à l'IPTG

Culots de 1 mL de culture de bactéries non-induites et induites à l'IPTG resuspendus dans 200 µl PBS (non-induit), 300 µl PBS (induit 4h) et 1mL PBS (induit 18h). Les échantillons sont soniqués 5 secondes à 50% d'intensité et analysés sur gel 15% SDS-PAGE. Le gel est ensuite coloré au bleu de coomassie. Pistes 1, 4 et 7: non-induit; pistes 2, 5, 8: 4h d'induction; pistes 3, 6, 9 : 18h d'induction. Pistes 1 à 3 : induction à 23°C. Pistes 4 à 6 : induction à 30°C; Pistes 7 à 9 : induction à 37°C. A) Induction avec 0.25 mM IPTG. B) Induction avec 0.5 mM IPTG. La position de GST-FrEst1p est indiquée à droite des gels.

Purification sur sépharose de glutathione

À chaque étape de purification, un aliquot a été pris et analysé sur gel afin de suivre la qualité de la purification. Tel qu'illustré à la figure 29, l'expression de la fusion Gst-FrEst1p se voit dans l'extrait total (piste 1). Lorsque l'extrait est incubé avec la résine et que le surnageant est enlevé, il ne reste plus beaucoup de Gst-FrEst1p dans la partie non-liée (piste 2). En effet, il est possible de voir que la majeure partie de Gst-FrEst1p présente dans l'extrait total se retrouve liée aux billes suite à l'incubation (piste 3). Des lavages sont ensuite faits afin d'enlever les protéines non-spécifiques (piste 4) et les éluions avec 20 mM de glutathione réduite sont effectuées. La piste 5 représente une première élution et beaucoup de Gst-FrEst1p se retrouve dans cette fraction. Deux autres éluions sont faites (piste 6) afin d'éluer le plus de protéine de fusion possible. Une grande quantité de Gst-FrEst1p est en effet éluee puisqu'il n'en reste pas beaucoup sur les billes après les éluions (piste 7). Finalement, les éluions sont combinées ensemble et clivées avec la thrombine pendant 2 heures (piste 8). Ce clivage se poursuit pour 16 heures supplémentaires puisque les éluions avec la thrombine sont dialysées contre le tampon de liaison pour les sépharoses CM ou SP. La piste 9 représente le produit final du clivage et de la dialyse. Cet échantillon est le point de départ de la purification sur les résines échangeuses d'ions.

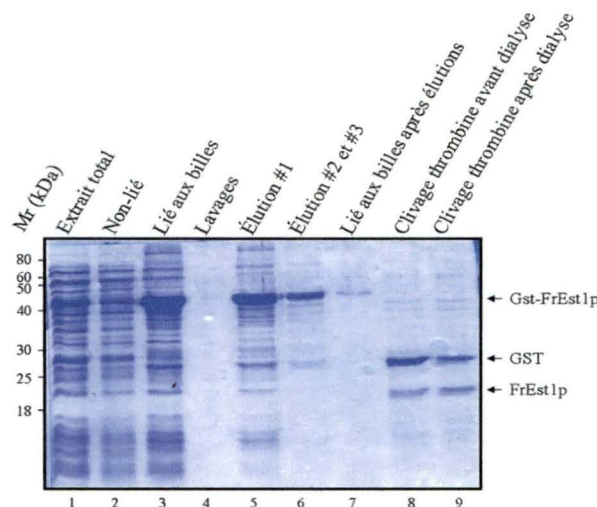


Figure 29 : Étapes de purification sur la sépharose de glutathione.

6.0 µg de l'extrait total, 6.0 µg du non-lié, 7.5 µg d'élution et 2.5 µg d'élution clivée ont été analysés et visualisés sur un gel SDS-PAGE 15% coloré au bleu de coomassie. 50 µl des de billes ont été resuspendus dans 100 µl de tampon Laemmli 2X (15µl sur gel). Piste 1 : extrait total; piste 2 : fraction non-liée; piste 3 : fraction liée sur les billes; piste 4 : lavages avec du PBS; piste 5 : élution #1, 20 mM glutathione réduite; piste 6 : éluions 2 et 3; piste 7 : fraction toujours liée aux billes après éluions; piste 8 : éluions clivées à la thrombine (après 2 hres); piste 9 : éluions clivées à la thrombine + dialysées pendant 16hres à 4°C.

Séparation de Gst et FrEst1p

Le système de purification avec la protéine Gst devrait, en principe, permettre une purification simple, rapide et efficace de la protéine désirée. À cet effet, la portion Gst peut être enlevée de deux façons. La première consiste à cliver la protéine de fusion lorsqu'elle est toujours liée à la résine. Se faisant, seulement la portion Est1p ainsi que de la thrombine se retrouvent en solution et un simple passage sur de la benzamidine permet la purification complète de FrEst1p. L'autre façon consiste à procéder aux éluions tel que décrit plus haut, cliver en solution, dialyser pour enlever la glutathione réduite et, ensuite, remettre des billes de glutathione sépharose. Ainsi, la portion Gst devrait recoller sur les billes, laissant ainsi FrEst1p seule dans le surnageant.

La figure 30 représente les résultats obtenus suite à l'essai des deux méthodes « traditionnelles » de purification sur sépharose de glutathione. La protéine de fusion Gst-FrEst1p a un poids moléculaire de 48 kDa tandis que les parties individuelles sont de 27 kDa pour Gst et 21 kDa pour le fragment Est1p. En A, le gel représente une tentative de purifier le fragment Est1p en clivant la protéine de fusion directement lorsqu'elle est liée aux billes. La piste 1 contient l'extrait total où la fusion Gst-FrEst1p est visible autour de 50 kDa. La fraction non-liée à la résine est représentée dans la piste 2 et il est possible de voir qu'il reste de la fusion dans cette fraction après la liaison sur la résine. Peut-être qu'une deuxième incubation avec les billes ou un deuxième passage sur la colonne augmenterait la quantité liée, mais l'expérience a tout de même été poursuivie puisqu'une bonne quantité de fusion Gst-FrEst1p a lié aux billes (piste 3). Les lavages sont effectués (piste 4) dans le but d'enlever le plus de protéines non-spécifiques pouvant « contaminer » l'échantillon final. Le clivage est effectué directement sur les billes avec la thrombine et, apparemment, aucune protéine ne s'est détachée de la résine (piste 5). Après le clivage, les billes sont lavées (piste 6) et les billes restantes après le clivage sont appliquées sur le gel (piste 7). Les protéines FrEst1p et Gst sont demeurées collées aux billes, ce qui explique l'absence de toute protéine dans la fraction du clivage. Afin d'enlever ce qui est collé sur les billes, une élution avec 20 mM de glutathione réduite a été effectuée (piste 9) et les deux protéines sont bel et bien éluées ensemble. Finalement, ce qui demeure lié aux billes est représenté à la piste 10. Donc le clivage directement sur les billes ne fonctionne pas très bien étant donné que la portion FrEst1p ne se retrouve pas dans la fraction du clivage et qu'elle est visible lorsque les billes de glutathione sont bouillies et

analysées sur gel. La figure 30B représente la méthode alternative qui consiste à éluer les protéines des billes de glutathione pour ensuite faire le clivage en solution et remettre des billes de glutathione afin d'enlever la portion Gst de la solution. Les pistes 1, 3 et 4 représentent les 3 éluions effectuées avec 20 mM de glutathione réduite. L'éluion #1 semble la plus efficace, bien que beaucoup de protéines non-spécifiques sont visibles sur le gel coloré au coomassie. De plus, malgré les 3 éluions, beaucoup de protéine de fusion Gst-FrEst1p demeure liée aux billes (piste 5) ce qui indique que d'autres éluions pourraient être effectuées dans le but de récupérer le maximum de fusion Gst-FrEst1p ou un gradient de glutathione réduite pourrait être fait. Ensuite, la solution de protéines contenant Gst-FrEst1p élue est clivée avec de la thrombine (10 U/mL de protéines, piste 6) puis la solution de protéines clivées est dialysée contre du PBS (piste 7) afin d'enlever la glutathione réduite. Les deux protéines (Gst et FrEst1p) sont en quantité quasi-équimolaire, ce qui est bien puisque, en principe, les deux protéines devraient se retrouver en quantité égale après le clivage. Un échantillon de la protéine Gst seule a été déposé dans le puits #8 à titre indicatif. Finalement, après la dialyse, des billes de glutathione sont ajoutées à la solution de protéines clivées (piste 9). La portion Gst devrait se lier aux billes à nouveau pour ne laisser que la portion FrEst1p en solution (avec la thrombine). Par contre, ce n'est pas ce qu'il est possible de voir sur le gel. Dans la piste 9, il est clair que l'ajout de billes de glutathione a réduit la quantité de Gst et de FrEst1p, avec une préférence pour Gst. La piste 10 représente les billes finales après l'ajout de billes de glutathione aux protéines clivées et on peut y voir que beaucoup de Gst a été récupérée, mais également de la protéine FrEst1p.

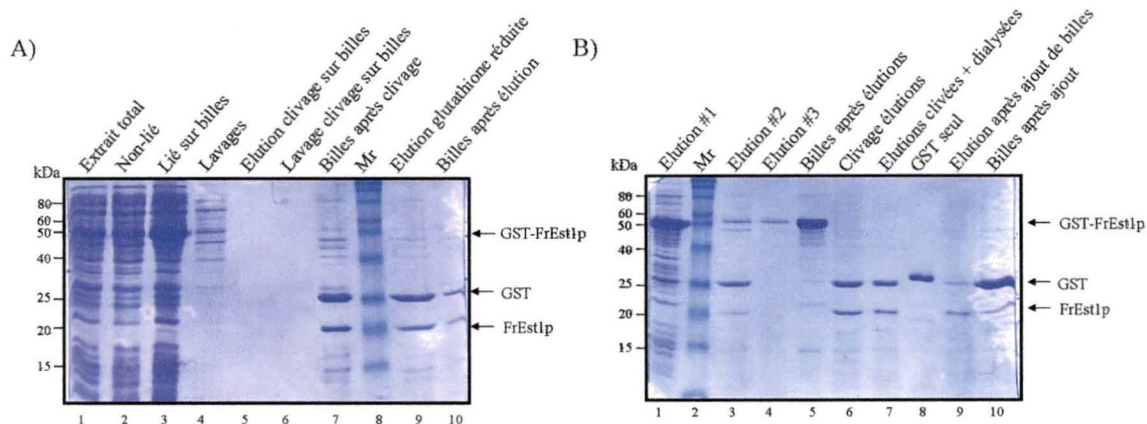


Figure 30 : Comparaison des 2 méthodes pour la purification sur résine de glutathione.

6.0 µg de l'extrait total, 6.0 µg du non-lié et 2.5 µg de tous les autres échantillons (excepté les billes) ont été analysés et visualisés sur un gel SDS-PAGE 15% coloré au bleu de coomassie. 50 µl des billes ont été resuspendus dans 100 µl de tampon Laemmli 2X (15 µl sur gel). A) Piste 8 : standards de poids moléculaire. La piste 1 : extrait total; piste 2 : non-lié; piste 3 : total lié aux billes; piste 4 : lavages; piste 5 : éluat du clivage sur billes; piste 6 : lavage des billes après clivage; piste 7 : billes après clivage; piste 9 : élution à la glutathione réduite; piste 10 : billes après élution à la glutathione réduite. B) Piste 2 : standards de poids moléculaire. Les pistes 1, 3 et 4 contiennent les 3 éluations faites avec de la glutathione réduite. Piste 5 : billes après éluations. Pistes 6 et 7 : éluations clivées (6) et dialysées (7). Piste 8 : GST seule (purifiée à partir du vecteur vide). Piste 9 : élution après ajout de billes de glutathione. Piste 10 : billes finales après le 2^{ème} ajout.

Les deux méthodes utilisées n'ont pas été idéales pour séparer FrEst1p de GST. FrEst1p semble avoir de l'affinité pour la résine de glutathione ou le lien qui unit GST et FrEst1p demeure même après le clivage à la thrombine. Plusieurs tests ont été effectués dans le but de séparer les protéines. L'ajout de détergents (Triton X-100, SDS), d'agents dénaturants (hydrochlorate de guanidine, 2-mercaptoéthanol) ainsi que du glycérol (défait les interactions électrostatiques) s'est avéré inutile puisqu'il était impossible de séparer les deux protéines. De plus, des éluations à différents pH et différentes concentrations de sel ont été effectuées, toujours sans succès. La figure 31 représente quelques uns de ces essais. En A, des essais à différents pH ont été effectués sur les billes de glutathione après le clivage à la thrombine. Puisque les protéines clivées ne semblent pas décoller des billes, les

lavages à différents pH pourraient permettre de séparer FrEst1p et laisser Gst collée sur les billes. Le résultat obtenu indique que peu importe le pH utilisé, les deux protéines ne sont pas séparées et demeurent sur les billes après les lavages (figure 31A, pistes 6 et 13). En B, un gradient croissant de KCl a été utilisé lors des lavages dans le but de séparer des possibles interactions ioniques entre les deux protéines. Même le lavage avec du KCl 1M n'a pas réussi à séparer les protéines puisqu'il est toujours possible de voir les deux protéines ensemble dans l'échantillon de billes après les lavages (figure 31B, piste 7). Un autre essai pour séparer les deux protéines a été effectué à l'aide d'agents qui brisent les liens non-ioniques entre les molécules. La figure 31C représente cet essai où, à gauche du gel, 2% v/v Tween-20 a été utilisé et à droite, 1% m/v SDS (à noter que ces concentrations de Tween-20 et de SDS sont suggérées par le fabricant des billes de glutathione). Le résultat illustré à la figure 31C démontre qu'encore une fois, malgré l'utilisation des deux agents, il est toujours impossible de séparer les deux protéines. De plus, l'utilisation de 1% m/v SDS détruit le lien qui relie la portion Gst aux billes de glutathione puisque celle-ci se retrouve en élution (piste nommée « E »). Finalement, à la figure 31D, l'hydrochlorate de guanidine, un agent dénaturant, a été utilisé dans le but de dénaturer les liens qui pourraient unir les deux protéines. Évidemment, l'utilisation de cet agent a complètement solubilisé les protéines sans préférence pour FrEst1p, et ce peu importe la concentration utilisée.

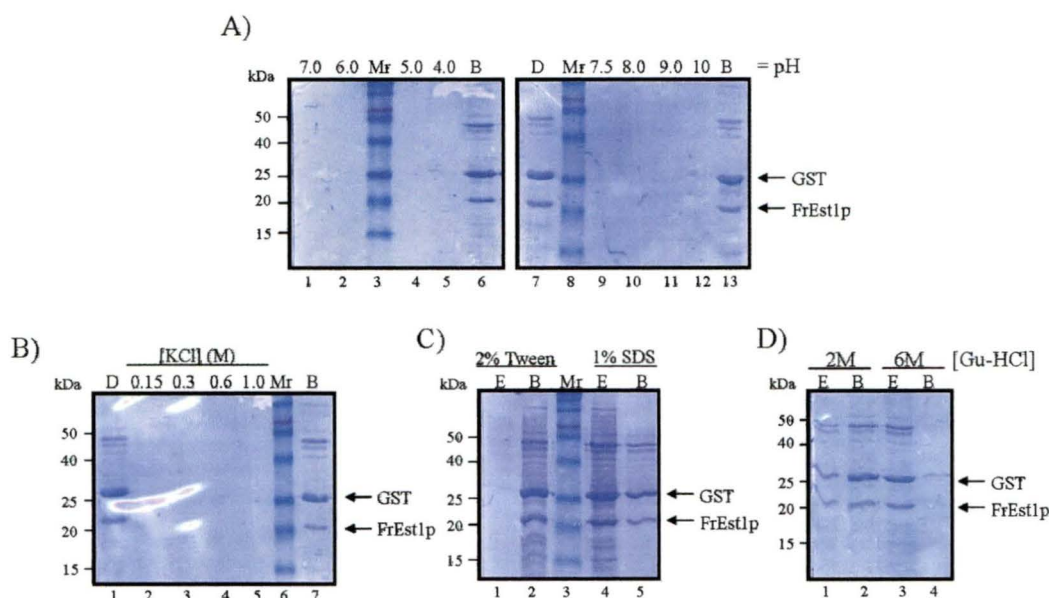


Figure 31 : Tentatives de séparation des protéines Gst et FrEst1p à l'aide de différentes méthodes.

2.5µg des éluions ont été analysés et visualisés sur un gel SDS-PAGE 15% coloré au bleu de coomassie. Environ 50 µl des échantillons de billes ont été resuspendus dans 100 µl de tampon Laemmli 2X (15 µl sur gel). La position des protéines Gst et FrEst1p est indiquée à droite des gels. Mr : standards de poids moléculaire; D : matériel de départ (*input*); B : billes finales après les lavages (élutions dans différentes conditions); E : Éluat. A) Lavages à différents pH. Le pH est indiqué au-dessus de chaque ligne. B) Lavages à différentes concentrations de KCl. La concentration de sel utilisée est indiquée au-dessus des pistes. C) Lavages avec 2% Tween (gauche) et 1% SDS (droite). D) Lavages avec de l'hydrochlorate de guanidine à 2M (gauche) et 6M (droite).

Étant donné qu'aucune des méthodes n'a fonctionné, d'autres techniques de séparation ont dû être envisagées. Parmi celles-ci, la purification sur des résines échangeuses d'ions a été choisie afin de profiter du fait que les deux protéines à séparer ont des points isoélectriques différents (tel que prédit par le programme *PepTool* et l'outil *ProtParam* sur www.expasy.org/tools). Le point isoélectrique prédit pour le fragment Est1p est de 10.0 et celui de la portion Gst est de 6.0. Étant donné que la purification s'effectue à un pH de 8.0, le fragment Est1p aura une charge nette positive et Gst aura une charge nette négative. À pH 8.0, la protéine FrEst1p

ayant une charge nette positive devrait, en principe, lier une résine échangeuse de cations (chargée négativement). La compagnie GE Healthcare produit deux types de résines échangeuse de cations : la CM sépharose (faible *i.e.* basée sur des acides faibles et chargée à un spectre de pH limité) et la SP sépharose (forte *i.e.* basée sur des acides forts et chargée à un spectre de pH étendu). Ces deux résines ont donc été utilisées afin de séparer les deux protéines. À noter que seulement les purifications faites par *batch* sont illustrées puisque les purifications effectuées sur le FPLC ont donné des échantillons trop dilués pour être vus sur un gel coloré au bleu de coomassie. Un gel coloré au nitrate d'argent a été nécessaire pour visualiser les protéines obtenues. Puisque la production d'anticorps dans les lapins nécessite au moins 1mg de protéines, il est important que la protéine purifiée soit au moins visible sur un gel coloré au bleu de coomassie.

La figure 32 illustre la purification sur résine de CM sépharose. Le gel de gauche représente les étapes de purification de Gst et FrEst1p avant de les mettre sur la CM sépharose (purification sur billes de glutathione). La piste 8 de ce gel contient 15µl de ce qui est ensuite incubé et lié avec les billes de CM sépharose. Le gel de droite représente les étapes de purification sur la CM sépharose. Encore une fois, la piste 9 contient l'échantillon de départ qui est appliqué à la résine. Des billes ont été récoltées juste après l'incubation avec les protéines afin de voir ce qui se lie à celle-ci. En principe, à la piste 10, nous devrions voir que la protéine FrEst1p se lie préférentiellement aux billes de CM sépharose et que Gst est moins présente. Par contre, ce n'est pas ce qu'on peut voir. Il y a quand même peu d'FrEst1p qui se lie par

rapport à Gst. La portion non-liée a été chargée dans la piste 11 et celle-ci démontre que FrEst1p s'est presque toute liée à la résine et qu'il ne reste que Gst dans la partie non-liée. Les pistes 13 à 16 comprennent les éluions faites à différentes concentrations de NaCl. Il est possible de détecter la portion FrEst1p dans la fraction éluee avec 0.3 M NaCl. Finalement, la piste 17 montre ce qui reste collé sur les billes après les éluions et il est possible de constater que seulement Gst demeure liée aux billes (il y a très peu de FrEst1p).

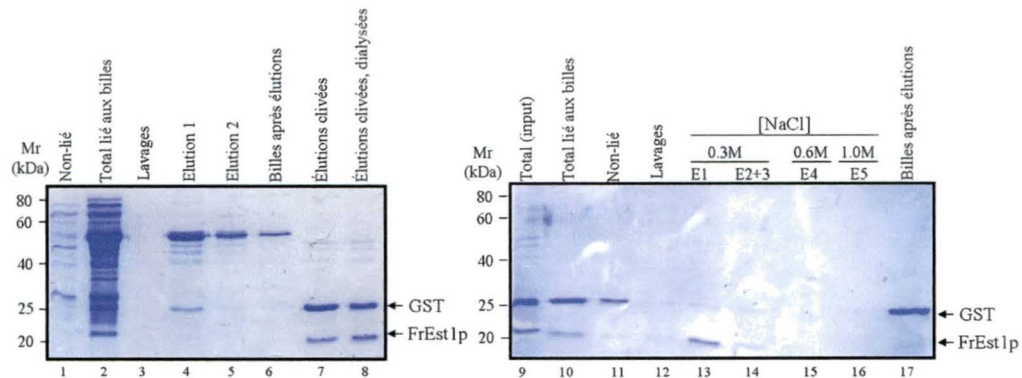


Figure 32 : Purification sur résine de CM sépharose.

7.0 µg d'élution et 2.5 µg des éluions clivées ont été analysés et visualisés sur un gel SDS-PAGE 15% coloré au bleu de coomassie. À droite, les éluions ont été quantifiées et 0.3 µg de protéines ont été chargées. 50 µl de billes ont été resuspendus dans 100 µl de tampon Laemmli 2X (15 µl sur gel). Mr : standards de poids moléculaire. Gel de gauche : purification sur billes de glutathione. Piste 1 : fraction non-liée; piste 2 : total lié aux billes; piste 3 : lavages; piste 4-6 : éluions; piste 6 : billes après éluions; piste 7 : éluions clivées à la thrombine; piste 8 : éluions clivées et dialysées. Gel de droite : purification sur billes de CM sépharose. Piste 9 : total (*input*); piste 10 : total lié aux billes; piste 11 : fraction non-liée; piste 12 : lavages; piste 13 à 16 : éluions à différentes [NaCl]; piste 17 : billes finales après les éluions.

Même si cette résine semblait efficace, la sépharose SP a tout de même été essayée dans le but d'augmenter la spécificité pour la liaison de FrEst1p (résine échangeuse d'ions forte). La figure 33 représente donc les étapes de purification à l'aide de la résine de sépharose SP. La piste #1 contient le matériel de départ, c'est-à-dire ce qui est incubé avec les billes au début de la purification. Gst et FrEst1p sont en

proportion quasi-égale. Ensuite, les pistes 2 à 5 représentent les fractions non-liées obtenues après chaque ajout additionnel d'incubation de 1 mL de l'*input* et incubation d'une heure (voir matériel et méthodes). Il est possible de voir aux pistes 5 et 6 qu'il y a un peu de FrEst1p dans la fraction non-liée. Ceci indiquerait que la résine est saturée après environ 3mL de fraction totale passée sur elle. La piste 6 contient la fraction des lavages. Un petit aliquot de billes après la liaison et les lavages a été pris et déposé sur le gel afin de voir si FrEst1p avait lié aux billes. Il est possible de constater qu'il y a un peu plus de FrEst1p liée aux billes que Gst, ce qui est une amélioration en spécificité par rapport à la sépharose CM. Les pistes 8 à 13 contiennent les échantillons obtenus suite aux éluions effectuées à différentes concentrations de sel. L'éluion #3 effectuée avec 0.3 M NaCl semble être celle où FrEst1p élue le plus bien qu'il est possible d'en détecter un peu à la 2^{ème} éluion à la même concentration de sel. Finalement, un aliquot des billes finales, après les éluions, a été pris et déposé sur gel (piste 14). Il reste beaucoup de Gst sur les billes et un peu de FrEst1p.

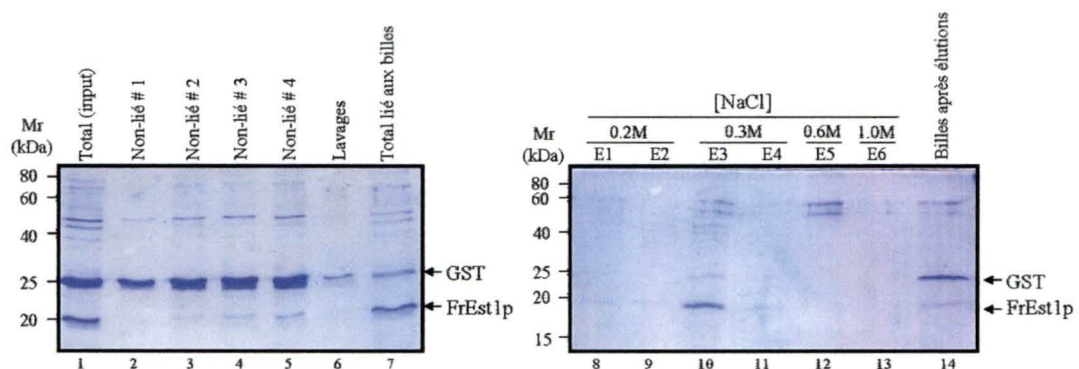


Figure 33 : Purification sur résine de SP sépharose.

2.5 µg de protéines ont été chargées sur le gel de gauche. À droite, les éluions ont été quantifiées et 0.3 µg de protéines ont été chargées (piste 10). Environ 50 µl des échantillons de billes ont été resuspendus dans 100 µl de tampon Laemmli 2X (mettre 15µl sur gel). Ces échantillons ont été analysés et visualisés sur un gel SDS-PAGE 15% coloré au bleu de coomassie. La position des protéines Gst et FrEst1p est indiquée à droite des gels. Mr : standards de poids moléculaire. Piste 1 : total (*input*); piste 2 à 5 : fractions non-liées; piste 6 : lavages; piste 7 : total lié aux billes après incubation et lavages; piste 8 à 13 : éluions à différentes [NaCl] (concentrations de sel indiquées au-dessus des pistes); piste 14 : billes finales après les éluions.

La quantité de protéine FrEst1p qui a été possible de purifier à l'aide des deux résines échangeuses d'ions est d'environ 50µg de protéines. Ceci n'est pas suffisant pour produire des anticorps dans les lapins. Par contre, étant donné que ces deux résultats ont été obtenus à l'aide de purification par *batch*, il est possible d'augmenter la quantité de protéines et de billes utilisées au départ. Afin de purifier 1mg de protéines, tout le processus devrait être augmenté d'environ 20 fois. Ceci est possible si toutes les étapes de purification sont optimisées (bien qu'elles le soient tout de même un peu) et que la purification est effectuée sur l'appareil FPLC.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

RÔLE DE Rnt1p DANS LA RÉGULATION DE LA TÉLOMÉRASE

Les résultats obtenus ont démontré que la ribonucléase Rnt1p semble posséder un rôle de régulateur négatif de la télomérase chez *Saccharomyces cerevisiae* en abaissant les niveaux d'ARN messagers, de protéines (du moins pour Est2p) et d'activité de la télomérase. Pour démontrer cet effet négatif de Rnt1p sur la télomérase, des résultats obtenus par Stéphanie Larose ont montré que la délétion du gène *RNT1* fait augmenter les niveaux d'ARN messagers des sous-unités de la télomérase. De plus, un buvardage Southern a montré qu'il y avait une légère augmentation de la taille des télomères dans une souche *rnt1Δ*. Un immunobuvardage de type Western a également été effectué et démontre une augmentation d'environ 2.9 fois de l'expression de la protéine ProA-Est2p dans une souche où la protéine Rnt1p est absente comparativement au type sauvage. Finalement, un autre résultat obtenu suite à un essai d'activité de télomérase *in vitro* suggère encore une fois que Rnt1p agirait à titre de régulateur négatif sur la télomérase. Tel que décrit dans la section Résultats du chapitre 1, une souche *rnt1Δ* possède 2.4 fois plus d'activité de télomérase qu'une souche de type sauvage. Ces résultats concordent avec la hausse en ARN messagers vue par micro-puce à ARN. Toutefois, rien n'indique que l'effet observé est spécifique à la protéine Rnt1p. Il se peut que des protéines chaperones ou autres éléments puissent interagir en *trans* et agir via Rnt1p sur la télomérase.

Afin de déterminer la spécificité de l'action de Rnt1p sur la télomérase, une souche exprimant une version thermosensible de *RNT1*, *rnt1-ts*, a été utilisée. Si l'action de Rnt1p est directe, l'utilisation de la souche thermosensible nous permettrait alors de suivre, dans le temps, l'augmentation de l'expression de ProA-Est2p et de l'activité de télomérase au fur et à mesure que Rnt1p n'est plus exprimée lorsque les cellules sont poussées à 37°C, le tout comparativement à une souche de type sauvage. L'expérience avec la souche exprimant l'allèle thermosensible *rnt1-ts*, à 37°C, a été effectuée mais les résultats obtenus ne nous ont pas permis de déterminer la spécificité de Rnt1p sur la protéine ProA-Est2p et sur l'activité de télomérase. Il semblerait qu'à 37°C, un autre processus plus général de dégradation soit impliqué qui entraînerait une dégradation de la protéine ProA-Est2p. À 37°C, il nous est impossible de détecter ni la protéine ProA-Est2p ni l'activité de télomérase suite à une augmentation de la température de 26°C à 37°C pendant 8 heures ou 24 heures. Autant le mutant que le type sauvage n'expriment plus de ProA-Est2p après 8 heures d'incubation à 37°C. Même après 24 heures, lorsque Rnt1p-ts est complètement absente, tel un *rnt1Δ*, il est impossible de détecter l'expression de ProA-Est2p. Le mécanisme de dégradation observé pourrait être relié à la protéine San1p qui, tel que mentionné dans un article publié par le groupe de Daniel E. Gottschling (Gardner *et al.*, 2005), serait impliquée dans un système de contrôle de qualité des protéines au niveau du noyau. Ce système pourrait entraîner la dégradation de protéines aberrantes, telles que des protéines étiquetées (ProA-Est2p), à 37°C, puisque celles-ci n'adopteraient pas une conformation endogène à la cellule. Nous ne pouvons affirmer

que ce mécanisme est la cause de l'absence de ProA-Est2p dans notre cas, mais en absence d'une autre hypothèse plausible, c'est le mécanisme que nous préconisons.

L'expérience avec les cellules exprimant l'allèle thermosensible *rnt1-ts* a donc été refaite mais à 33°C. À cette température, la version thermosensible de Rnt1p est également affectée mais il semblerait que, selon les résultats obtenus, le mécanisme général (mais inconnu) de dégradation des protéines serait moins actif qu'à 37°C. De ce fait, il nous a donc été possible de confirmer que l'action de Rnt1p sur la télomérase est bel et bien spécifique puisque l'incubation de la souche *rnt1-ts* à 33°C pendant 8 heures et 24 heures montre une augmentation de l'expression de la protéine ProA-Est2p par rapport à la souche de type sauvage. En effet, après 24 heures à 33°C, ProA-Est2p ne peut être détectée dans l'extrait immunoprécipité du type sauvage, mais une forte expression est vue pour le mutant exprimant l'allèle thermosensible. Tout ceci indique donc que Rnt1p agirait de façon spécifique sur une ou plusieurs des ARNs codant pour les sous-unités de la télomérase, ce qui se traduirait également par une modification du patron d'expression des protéines, du moins pour ProA-Est2p. Cette hausse en protéine se traduit en une hausse de l'activité de la télomérase. Par contre, on ne peut exclure que l'activité spécifique de la télomérase n'est pas influencée par la protéine Rnt1p à l'aide des résultats obtenus.

Il a été démontré par les groupes des Drs Shérif Abou Elela et Dominique Fourmy (Lebars *et al.*, 2001) que la ribonucléase Rnt1p reconnaît et clive une structure tige-tétraboucle de certains ARN messagers chez la levure *Saccharomyces*

cerevisiae. Un criblage informatique a été effectué dans le but d'identifier des structures spécifiques pour la reconnaissance et le clivage par Rnt1p qui pourraient être présentes dans les ARN messagers codant pour les sous-unités de la télomérase. Ce criblage a identifié que l'ARN messenger de la protéine Est1p possède une structure reconnue par Rnt1p. Cette structure est clivée spécifiquement par Rnt1p (travaux effectués par Stéphanie Larose) et ce clivage causerait les augmentations observées par mécanisme de rétroaction (*feedback*). Ces travaux seront publiés dans un article s'intitulant « RNase III-Dependent Regulation of Yeast Telomerase. » (*Larose et al. 2006*, soumis).

La délétion de *RNT1* chez *Saccharomyces cerevisiae* cause non seulement un changement dans l'expression des ARN messagers codant pour les sous-unités de la télomérase mais également un changement général dans l'expression de plusieurs autres ARN messagers impliqués dans d'autres processus cellulaires. Au niveau des protéines, d'autres processus cellulaires tels que celui de l'utilisation du glucose comme source de carbone et celui du contrôle de l'homéostasie du fer dans la cellule sont affectés par la délétion de *RNT1* tout comme l'est le processus du maintien des télomères (Ge *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005). Au niveau de la télomérase, très peu est connu en ce qui a trait aux facteurs régulant l'expression des sous-unités. On sait que la surexpression de l'une des protéines de la télomérase seulement ne cause aucun effet sur l'expression des autres sous-unités et qu'une augmentation de l'activité de télomérase se fait seulement lorsque l'expression de la majorité des composantes est augmentée (Peterson *et al.*, 2001; Snow *et al.*, 2003; Teo et Jackson, 2001). De plus,

d'autres études ont été faites sur la régulation de la télomérase et il a été démontré que la délétion de certains gènes impliqués dans le NMD (« *non-sense mediated decay* ») causerait une augmentation spécifique de tous les ARN messagers codant pour les sous-unités de la télomérase. Par contre, contrairement à la délétion de *RNT1*, l'absence de ces gènes et la hausse en expression des ARN messagers de la télomérase causent un raccourcissement de la longueur des télomères plutôt qu'un rallongement tel qu'observé dans une souche *rnt1Δ* (Dahlseid *et al.*, 2003). Rnt1p est donc maintenant un nouveau facteur proposé pour la régulation de l'expression des sous-unités de la télomérase, soit via une action directe sur les ARN messagers codant pour l'holoenzyme ou via un autre facteur qui lui agit sur ces différentes protéines.

PURIFICATION DE LA TÉLOMÉRASE

Étant donné l'avancement des connaissances sur l'holoenzyme de la télomérase à l'aide des versions étiquetées des protéines qui le composent, il est devenu presque primordial d'étudier la télomérase de *Saccharomyces cerevisiae* dans son état natif. Ceci permettrait, entre autre, de mieux connaître la stœchiométrie des différentes protéines, si l'une d'entre elles est présente en dimère par exemple, connaître les constantes biochimiques de l'enzyme telle que la constante de dissociation et plusieurs autres particularités de l'enzyme qui pourraient être influencées par la présence d'une étiquette. Ces données pourraient permettre, entre autre, de mieux comprendre comment la télomérase se lie à l'ADN et ajoute les répétitions télomériques et élucider le « mystère » de sa processivité. Dans le but de

tenter de répondre à ces questions, d'autres groupes ont utilisé la résine de DEAE pour purifier partiellement la télomérase dans son état natif (sans utilisation d'étiquette protéique) (Cohn et Blackburn, 1995; Lue et Peng, 1998; Lue et Xia, 1998). Cette purification se fait sur billes libres et permet une élution à 900 mM de sel de la télomérase où l'activité *in vitro* est présente.

Notre but au Chapitre 2 était donc de répéter cette technique mais en utilisant l'appareil de FPLC. Étant donné qu'aucun anticorps n'existe contre les sous-unités de la télomérase et que nous devions avoir un moyen de suivre le processus de purification en vérifiant la présence (ou l'absence) des protéines, une version étiquetée d'Est2p, ProA-Est2p a été utilisée. De cette façon, chaque étape de purification a pu être analysée par immunobuvardage de type Western avec un anticorps contre la protéine A. Les résultats obtenus suite à cette analyse ont démontré qu'il était possible de purifier la protéine ProA-Est2p à l'aide de la colonne DEAE, via l'utilisation du FPLC. Par contre, beaucoup de protéines demeurent dans la fraction non-liée et les lavages faits à différentes concentrations de sel ne sont pas spécifiques puisqu'il est possible d'y détecter ProA-Est2p. Par ailleurs, tel que décrit par les auteurs des références précédemment citées, la sous-unité catalytique de la télomérase est éluée à 900 mM NaOAc. La composante enzymatique de la télomérase a donc pu être purifiée partiellement à l'aide de la DEAE sur un FPLC. Afin d'améliorer la spécificité lors des lavages et favoriser une liaison plus forte de la télomérase à la résine, l'étape de liaison pourrait se faire plus lentement afin de permettre un meilleur contact des protéines avec la résine. De plus, une résine à

échangeuse d'anions forte (Q sépharose) au lieu de faible (DEAE sépharose) pourrait être utilisée dans le but d'augmenter la force de l'interaction entre la résine et la protéine ProA-Est2p.

Toujours dans le but de purifier l'holoenzyme de la télomérase dans son état natif et actif, il était important que l'ARN *TLC1* soit présent dans les fractions purifiées puisque celui-ci est essentiel à l'activité catalytique *in vitro*. Des réactions de RT-PCR ciblant l'ARN ont donc été mises au point afin d'identifier les fractions où *TLC1* co-purifie avec la sous-unité catalytique ProA-Est2p (identifiée par immunobuvardage de type Western). Les fractions où les deux composantes sont présentes devraient donc posséder de l'activité *in vitro* si la télomérase est purifiée de façon non-dénaturante. Les résultats qui ont été obtenus suite à la mise au point de la technique de RT-PCR ont été un peu décevants au niveau de la spécificité de purification puisque 2 essais sur 3 montraient que le lavage effectué à 550 mM NaOAc éluait également *TLC1*, au même titre que l'élution à 900 mM NaOAc. Le RT-PCR démontre donc qu'il y a des pertes lors des lavages mais que tout de même, les éléments nécessaires à l'activité *in vitro* sont présents et la vérification de cette activité pouvait maintenant être effectuée.

Des essais d'activité de télomérase *in vitro* ont donc été adaptés pour de plus grands volumes de réactions. Ces essais ont été effectués sur les fractions les plus importantes, soit : le total appliqué sur la colonne, le non-lié, lavages à 300 mM et 550 mM NaOAc et l'élution à 900 mM NaOAc. Malheureusement, les premiers essais

effectués directement sur les fractions n'ont pas donné les résultats escomptés puisqu'aucune activité n'a été détectée. Par ailleurs, une activité inconnue a été identifiée dans nos fractions et quelques investigations ont été faites, sans toutefois démontrer une quelconque implication de la télomérase. Les fractions semblaient donc inactives pour l'activité de télomérase. Une des raisons pour laquelle l'activité enzymatique peut être abolie est la grande présence de sel dans les fractions. Un essai a été effectué sur des immunoprécipitations de ProA-Est2p + *TLC1* (billes sépharose IgG) dans lesquelles une concentration croissante d'acétate de sodium a été ajoutée. Ce test s'est avéré révélateur sur l'impact de la présence de sel dans les fractions puisqu'aucune activité n'a été détectée dans les échantillons avec du sel. Les fractions ont donc été dialysées pour rendre la concentration de sel à un niveau physiologique, soit 150 mM. De plus, nous suspectons que les fractions n'étaient pas assez concentrées pour que l'activité de télomérase soit détectable. Des immunoprécipitations à l'aide de billes IgG ont été faites sur les fractions dialysées dans le but d'enrichir en ProA-Est2p et *TLC1*. L'activité de télomérase a été détectée dans l'extrait total qui a été appliqué sur les billes (résultat attendu) et également dans la fraction non-liée. Les fractions à 300 mM, 550 mM et 900 mM NaOAc ne contenaient aucune activité, même après dialyse. Ce résultat nous a donc indiqué que beaucoup de télomérase est perdue dans le non-lié et qu'il n'y a peut-être pas suffisamment de protéines dans les fractions intéressantes pour y voir de l'activité. Ce point a été prouvé par l'essai suivant qui consistait à diluer toutes les fractions jusqu'à la plus basse concentration de protéines, soit celle de la fraction à 900 mM NaOAc. Ensuite, une immunoprécipitation et un essai d'activité ont été faits et le résultat a

clairement démontré que les fractions étaient trop diluées pour y voir de l'activité : l'extrait total dilué ne démontrait plus aucune activité alors qu'au résultat précédent, le même échantillon en possédait. Les tentatives de purification de l'holoenzyme sur la colonne DEAE ont donc été terminées à ce point.

Il est étonnant de constater que notre méthode de purification a échoué alors qu'elle fonctionne pour plusieurs groupes (Cohn et Blackburn, 1995; Lue et Peng, 1998; Lue et Xia, 1998). Les quelques différences entre la méthode utilisée dans notre laboratoire et celles utilisées par ces groupes font en sorte qu'il nous a été impossible d'obtenir une fraction active à 900 mM acétate de sodium. Je crois que la principale différence entre les deux méthodes de purification se situe à ce niveau : le groupe de Neal F. Lue utilise un plus grand volume de culture initial (4 litres au lieu de 2 litres dans notre cas). Il est donc évident, vue la faible quantité de télomérase dans les cellules de levure (Mozdy et Cech, 2006), que notre purification faite à partir de 2 litres de culture est bien en-dessous du seuil nécessaire pour détecter de l'activité de télomérase dans les fractions éluées avec 900 mM NaOAc. De plus, dans certain cas, un appareil pour brasser les billes de verre (« *bead beater* ») avec les cellules a été utilisé par les autres groupes et ceci contribue grandement à augmenter le rendement puisque cet appareil aide à lyser un maximum de cellules (Lue et Wang, 1995). Afin de s'assurer d'avoir suffisamment de télomérase dans nos extraits protéiques, une combinaison de tous ces facteurs pourrait être envisagée : l'utilisation d'un fermenteur (un litre de culture dans un fermenteur équivaut à environ 3-4 litres de culture en incubateur) pour augmenter la quantité de cellules par litre de culture ainsi que

l'homogénéisation des cellules à l'aide d'un « *bead beater* » ou d'un homogénéiseur. Il est à noter que la purification d'autres complexes protéiques tels que l'ARN polymérase II de la levure, par exemple, a nécessité plus de 60 litres de culture (ou 500 grammes de culot) afin d'obtenir la quantité d'enzyme requise pour des essais enzymatiques *in vitro* (Li et al., 1996). Il est donc évident que la méthode de purification nécessitera de plus grands volumes de culture afin de détecter de l'activité enzymatique.

PURIFICATION DU FRAGMENT D'Est1p

Les résultats obtenus suite aux nombreuses tentatives de purification d'un fragment de la protéine Est1p n'ont pas été très encourageants. En fait, plusieurs hypothèses peuvent être soulevées sur le fait que le fragment Est1p ne peut être séparé entièrement et en grande quantité de la portion Gst. Il se peut que la protéine ait de l'affinité pour la sépharose, matrice utilisée pour la fabrication des différentes résines. Cette conclusion provient du fait que le fragment ne peut tout simplement pas se séparer des billes lorsqu'on procède aux éluions et ce autant pour la résine de glutathione que les échangeuses d'ions. De plus, la sépharose utilisée comme support aux groupes chargés des résines échangeuses d'ions est très similaire à celle utilisée pour la filtration sur gel. La sépharose forme donc un genre de treillis qui agit comme un tamis moléculaire et provoque la rétention des protéines à partir d'un certain poids moléculaire (http://instruct1.cit.cornell.edu/courses/biobm330/protlab/Ion_Exchange.html). Il est possible que ce soit ce qui arrive dans notre cas. Le fragment Est1p reste pris

dans le filet de sépharose et il devient difficile de l'éluer par la suite par les méthodes conventionnelles.

Il existe d'autres matrices qui pourraient être utilisées à la place de la sépharose, la cellulose en est d'ailleurs un exemple. La cellulose utilisée comme matrice pour les colonnes échangeuses d'ions peut être un meilleur choix que la sépharose pour la raison énoncée ci-haut. Par contre, la cellulose possède une plus faible capacité d'absorption que la sépharose donc le protocole de purification devra être adapté. Une autre méthode de chromatographie pourrait également être envisagée et il s'agit de la filtration sur gel. Le principe de la filtration sur gel consiste à utiliser de billes ayant différentes tailles de pores, retenant ainsi différentes grosseurs de protéines. Les plus petites sont retardées dans la colonne et les plus grosses ont tendance à passer tout droit. Étant donné que Gst et Est1p ont deux poids moléculaires différents, bien qu'assez rapprochés, il serait possible d'utiliser la filtration sur gel pour les séparer. Une grande colonne devra être utilisée afin d'augmenter la résolution pour séparer les deux protéines. Par contre, ce genre de colonne peut contenir des petits volumes et les échantillons sont souvent très dilués à la fin du processus. Encore une fois, un problème de faible concentration de protéines finales pourrait avoir lieu.

La solution la plus drastique mais qui semble tout de même être la meilleure serait d'utiliser une autre étiquette d'affinité pour purifier le fragment d'Est1p. Les tentatives qui ont été effectuées au tout début du projet ont été d'utiliser l'hexamère d'histidine comme étiquette, mais devant la protéine Est1p complète. Ces résultats ont

démontré que la protéine de fusion était insoluble et c'est à ce moment que nous avons changé pour GST, puisque cette étiquette est connue pour aider à la solubilisation des protéines recombinantes (Terpe, 2003). Par contrainte de temps, la purification avec l'étiquette d'hexahistidine devant le fragment d'Est1p n'a pas été effectuée pour ce mémoire.

En résumé, les travaux effectués dans ce mémoire n'ont pas tous donné les résultats escomptés. Les résultats obtenus avec les mutants de Rnt1p nous ont tout de même permis de découvrir une possible régulation de la télomérase au niveau des ARNs qui encodent les sous-unités de l'holoenzyme. Cette régulation via la ribonucléase Rnt1p se traduirait en une baisse des niveaux d'ARNs, de protéines ainsi que de l'activité de la télomérase. Évidemment, il aurait été intéressant de pouvoir analyser l'effet de Rnt1p sur les autres sous-unités de la télomérase, principalement Est1p, mais la purification de la protéine n'a pas été fructueuse et les anticorps n'ont pu être produits. Par contre, ces travaux et ceux de Stéphanie mèneront à la publication d'un article scientifique.

En rapport avec la purification de la télomérase en conditions natives, les travaux de ce mémoire ont démontré qu'il est difficile de détecter de l'activité de télomérase dans les fractions obtenues par purification sur colonne DEAE. La purification de la télomérase dans son état natif n'est probablement pas utopique mais la télomérase elle-même est le principal obstacle vu sa très faible abondance dans la cellule (Mozdy et Cech, 2006). Un autre projet a débuté dans le laboratoire et cible

l'ARN *TLC1* comme échafaudage pour la purification en y insérant une étiquette d'ARN. Par ailleurs, l'utilisation de l'étiquette TAP pourrait également être envisagée soit via une des protéines de l'holoenzyme ou indirectement via l'ARN *TLC1*. Cette étiquette a pour avantage de permettre une double purification (élimine beaucoup de non-spécifique et de contaminants). De plus, l'étiquette est entièrement clivable s'il est placé en N-terminal, donc les constituants de la télomérase peuvent être analysés dans leurs conditions natives. Cette méthode permet donc une purification rapide en conditions natives même lorsque les complexes protéiques sont exprimés à leur niveau naturel (Puig *et al.*, 2001). Qui sait, peut-être pourrions-nous y découvrir de nouvelles protéines impliquées dans la régulation, le recrutement ou l'activité de la télomérase.

REMERCIEMENTS

Je voudrais d'abord remercier mes deux directeurs de recherche, Dr Raymund J. Wellinger et Dr Sherif Abou Elela. Je les remercie de m'avoir accueillie dans leurs laboratoires et de m'avoir permis de perfectionner mes connaissances scientifiques. J'apprécie tous les encouragements qu'ils m'ont donnés et leur motivation à poursuivre des projets qui n'ont pas toujours été faciles. Je remercie également ma famille et mes amis pour leur support moral et leurs encouragements constants. Je voudrais aussi remercier les membres de mes deux laboratoires ainsi que les membres du département, passés et présents, pour les discussions et l'ambiance agréables qu'ils contribuent à maintenir. Je remercie particulièrement Mme Catherine Desrosiers pour tous ses bons conseils, ses connaissances et son temps dans l'élaboration de mes différentes purifications. Je remercie Dr Katherine Friedman pour les souches utilisées. Finalement, je remercie le Dr Antonio Conconi et le Dr Martin Bisailon pour avoir accepté de faire partie de mon jury de mémoire.

RÉFÉRENCES

- Abou Elela, S., and Ares, M., Jr. (1998). Depletion of yeast RNase III blocks correct U2 3' end formation and results in polyadenylated but functional U2 snRNA. *EMBO J* 17, 3738-3746.
- Abou Elela, S., Igel, H., and Ares, M., Jr. (1996). RNase III cleaves eukaryotic preribosomal RNA at a U3 snoRNP-dependent site. *Cell* 85, 115-124.
- Autexier, C., Pruzan, R., Funk, W. D., and Greider, C. W. (1996). Reconstitution of human telomerase activity and identification of a minimal functional region of the human telomerase RNA. *EMBO J* 15, 5928-5935.
- Bachand, F., and Autexier, C. (1999). Functional reconstitution of human telomerase expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 274, 38027-38031.
- Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 10, 411-421.
- Banik, S. S., Guo, C., Smith, A. C., Margolis, S. S., Richardson, D. A., Tirado, C. A., and Counter, C. M. (2002). C-terminal regions of the human telomerase catalytic subunit essential for in vivo enzyme activity. *Mol Cell Biol* 22, 6234-6246.
- Beattie, T. L., Zhou, W., Robinson, M. O., and Harrington, L. (1998). Reconstitution of human telomerase activity in vitro. *Curr Biol* 8, 177-180.
- Blackburn, E. H., and Gall, J. G. (1978). A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol* 120, 33-53.
- Blackburn, E. H., Greider, C. W., Henderson, E., Lee, M. S., Shampay, J., and Shippen-Lentz, D. (1989). Recognition and elongation of telomeres by telomerase. *Genome* 31, 553-560.
- Blasco, M. A., Funk, W., Villeponteau, B., and Greider, C. W. (1995). Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA. *Science* 269, 1267-1270.

- Blasco, M. A., Lee, H. W., Hande, M. P., Samper, E., Lansdorp, P. M., DePinho, R. A., and Greider, C. W. (1997). Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* *91*, 25-34.
- Boule, J. B., Vega, L. R., and Zakian, V. A. (2005). The yeast Pif1p helicase removes telomerase from telomeric DNA. *Nature* *438*, 57-61.
- Bourns, B. D., Alexander, M. K., Smith, A. M., and Zakian, V. A. (1998). Sir proteins, Rif proteins, and Cdc13p bind *Saccharomyces* telomeres in vivo. *Mol Cell Biol* *18*, 5600-5608.
- Cano, M. I., Blake, J. J., Blackburn, E. H., and Agabian, N. (2002). A *Trypanosoma brucei* protein complex that binds G-overhangs and co-purifies with telomerase activity. *J Biol Chem* *277*, 896-906.
- Causton, H. C., Ren, B., Koh, S. S., Harbison, C. T., Kanin, E., Jennings, E. G., Lee, T. I., True, H. L., Lander, E. S., and Young, R. A. (2001). Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol Biol Cell* *12*, 323-337.
- Chanfreau, G., Elela, S. A., Ares, M., Jr., and Guthrie, C. (1997). Alternative 3'-end processing of U5 snRNA by RNase III. *Genes Dev* *11*, 2741-2751.
- Chapon, C., Cech, T. R., and Zaug, A. J. (1997). Polyadenylation of telomerase RNA in budding yeast. *RNA* *3*, 1337-1351.
- Chappell, A. S., and Lundblad, V. (2004). Structural elements required for association of the *Saccharomyces cerevisiae* telomerase RNA with the Est2 reverse transcriptase. *Mol Cell Biol* *24*, 7720-7736.
- Chen, J. L., Blasco, M. A., and Greider, C. W. (2000). Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell* *100*, 503-514.
- Chen, J. L., and Greider, C. W. (2004). Telomerase RNA structure and function: implications for dyskeratosis congenita. *Trends Biochem Sci* *29*, 183-192.
- Chen, J. L., and Greider, C. W. (2005). Functional analysis of the pseudoknot structure in human telomerase RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 8080-8085.

- Cohn, M., and Blackburn, E. H. (1995). Telomerase in yeast. *Science* 269, 396-400.
- Colgin, L. M., Baran, K., Baumann, P., Cech, T. R., and Reddel, R. R. (2003). Human POT1 facilitates telomere elongation by telomerase. *Curr Biol* 13, 942-946.
- Collins, K. (2000). Mammalian telomeres and telomerase. *Curr Opin Cell Biol* 12, 378-383.
- Collins, K., and Greider, C. W. (1993). Tetrahymena telomerase catalyzes nucleolytic cleavage and nonprocessive elongation. *Genes Dev* 7, 1364-1376.
- Cong, Y. S., Wen, J., and Bacchetti, S. (1999). The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Hum Mol Genet* 8, 137-142.
- Conrad, M. N., Wright, J. H., Wolf, A. J., and Zakian, V. A. (1990). RAP1 protein interacts with yeast telomeres in vivo: overproduction alters telomere structure and decreases chromosome stability. *Cell* 63, 739-750.
- Counter, C. M., Hirte, H. W., Bacchetti, S., and Harley, C. B. (1994). Telomerase activity in human ovarian carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2900-2904.
- Counter, C. M., Meyerson, M., Eaton, E. N., and Weinberg, R. A. (1997). The catalytic subunit of yeast telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9202-9207.
- Dahlseid, J. N., Lew-Smith, J., Lelivelt, M. J., Enomoto, S., Ford, A., Desruisseaux, M., McClellan, M., Lue, N., Culbertson, M. R., and Berman, J. (2003). mRNAs encoding telomerase components and regulators are controlled by UPF genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 2, 134-142.
- Dandjinou, A. T., Levesque, N., Larose, S., Lucier, J. F., Abou Elela, S., and Wellinger, R. J. (2004). A phylogenetically based secondary structure for the yeast telomerase RNA. *Curr Biol* 14, 1148-1158.
- de Lange, T., Shiue, L., Myers, R. M., Cox, D. R., Naylor, S. L., Killery, A. M., and Varmus, H. E. (1990). Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol* 10, 518-527.

Evans, S. K., and Lundblad, V. (1999). Est1 and Cdc13 as comediators of telomerase access. *Science* *286*, 117-120.

Evans, S. K., and Lundblad, V. (2002). The Est1 subunit of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase makes multiple contributions to telomere length maintenance. *Genetics* *162*, 1101-1115.

Feng, J., Funk, W. D., Wang, S. S., Weinrich, S. L., Avilion, A. A., Chiu, C. P., Adams, R. R., Chang, E., Allsopp, R. C., Yu, J., and et al. (1995). The RNA component of human telomerase. *Science* *269*, 1236-1241.

Forstemann, K., and Lingner, J. (2001). Molecular basis for telomere repeat divergence in budding yeast. *Mol Cell Biol* *21*, 7277-7286.

Forstemann, K., and Lingner, J. (2005). Telomerase limits the extent of base pairing between template RNA and telomeric DNA. *EMBO Rep* *6*, 361-366.

Forstemann, K., Zaug, A. J., Cech, T. R., and Lingner, J. (2003). Yeast telomerase is specialized for C/A-rich RNA templates. *Nucleic Acids Res* *31*, 1646-1655.

Friedman, K. L., and Cech, T. R. (1999). Essential functions of amino-terminal domains in the yeast telomerase catalytic subunit revealed by selection for viable mutants. *Genes Dev* *13*, 2863-2874.

Friedman, K. L., Heit, J. J., Long, D. M., and Cech, T. R. (2003). N-terminal domain of yeast telomerase reverse transcriptase: recruitment of Est3p to the telomerase complex. *Mol Biol Cell* *14*, 1-13.

Gardner, R. G., Nelson, Z. W., and Gottschling, D. E. (2005). Degradation-mediated protein quality control in the nucleus. *Cell* *120*, 803-815.

Garvik, B., Carson, M., and Hartwell, L. (1995). Single-stranded DNA arising at telomeres in *cdc13* mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint. *Mol Cell Biol* *15*, 6128-6138.

Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D., and Brown, P. O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* *11*, 4241-4257.

Gasch, A. P., and Werner-Washburne, M. (2002). The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation. *Funct Integr Genomics* 2, 181-192.

Ge, D., Lamontagne, B., and Elela, S. A. (2005). RNase III-Mediated Silencing of a Glucose-Dependent Repressor in Yeast. *Curr Biol* 15, 140-145.

Gilley, D., and Blackburn, E. H. (1999). The telomerase RNA pseudoknot is critical for the stable assembly of a catalytically active ribonucleoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6621-6625.

Gottschling, D. E., Aparicio, O. M., Billington, B. L., and Zakian, V. A. (1990). Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. *Cell* 63, 751-762.

Grandin, N., Damon, C., and Charbonneau, M. (2000). Cdc13 cooperates with the yeast Ku proteins and stn1 To regulate telomerase recruitment. *Mol Cell Biol* 20, 8397-8408.

Grandin, N., Damon, C., and Charbonneau, M. (2001). Ten1 functions in telomere end protection and length regulation in association with Stn1 and Cdc13. *EMBO J* 20, 1173-1183.

Grandin, N., Reed, S. I., and Charbonneau, M. (1997). Stn1, a new *Saccharomyces cerevisiae* protein, is implicated in telomere size regulation in association with Cdc13. *Genes Dev* 11, 512-527.

Greider, C. W. (1991). Telomerase is processive. *Mol Cell Biol* 11, 4572-4580.

Greider, C. W., and Blackburn, E. H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43, 405-413.

Greider, C. W., and Blackburn, E. H. (1987). The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* 51, 887-898.

Greider, C. W., and Blackburn, E. H. (1989). A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 337, 331-337.

Griffith, J. D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianchi, A., Moss, H., and de Lange, T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97, 503-514.

Hackett, J. A., Feldser, D. M., and Greider, C. W. (2001). Telomere dysfunction increases mutation rate and genomic instability. *Cell* 106, 275-286.

Hardy, C. F., Sussel, L., and Shore, D. (1992). A RAP1-interacting protein involved in transcriptional silencing and telomere length regulation. *Genes Dev* 6, 801-814.

Harley, C. B., Futcher, A. B., and Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458-460.

Harrington, L. (2003). Biochemical aspects of telomerase function. *Cancer Lett* 194, 139-154.

Harrington, L., Hull, C., Crittenden, J., and Greider, C. (1995). Gel shift and UV cross-linking analysis of *Tetrahymena* telomerase. *J Biol Chem* 270, 8893-8901.

Hastie, N. D., Dempster, M., Dunlop, M. G., Thompson, A. M., Green, D. K., and Allshire, R. C. (1990). Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 346, 866-868.

Hughes, T. R., Evans, S. K., Weilbaecher, R. G., and Lundblad, V. (2000). The Est3 protein is a subunit of yeast telomerase. *Curr Biol* 10, 809-812.

Jady, B. E., Richard, P., Bertrand, E., and Kiss, T. (2006). Cell cycle-dependent recruitment of telomerase RNA and Cajal bodies to human telomeres. *Mol Biol Cell* 17, 944-954.

Kilian, A., Bowtell, D. D., Abud, H. E., Hime, G. R., Venter, D. J., Keese, P. K., Duncan, E. L., Reddel, R. R., and Jefferson, R. A. (1997). Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Hum Mol Genet* 6, 2011-2019.

Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L., and Shay, J. W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 2011-2015.

Kirk, K. E., Harmon, B. P., Reichardt, I. K., Sedat, J. W., and Blackburn, E. H. (1997). Block in anaphase chromosome separation caused by a telomerase template mutation. *Science* 275, 1478-1481.

Klobutcher, L. A. (1977). Aging and frequency-dependent mating in *Drosophila*. *Behav Genet* 7, 33-36.

Larrivee, M., LeBel, C., and Wellinger, R. J. (2004). The generation of proper constitutive G-tails on yeast telomeres is dependent on the MRX complex. *Genes Dev* 18, 1391-1396.

Lebars, I., Lamontagne, B., Yoshizawa, S., Aboul-Elela, S., and Fourmy, D. (2001). Solution structure of conserved AGNN tetraloops: insights into Rnt1p RNA processing. *EMBO J* 20, 7250-7258.

Lee, A., Henras, A. K., and Chanfreau, G. (2005). Multiple RNA surveillance pathways limit aberrant expression of iron uptake mRNAs and prevent iron toxicity in *S. cerevisiae*. *Mol Cell* 19, 39-51.

Lendvay, T. S., Morris, D. K., Sah, J., Balasubramanian, B., and Lundblad, V. (1996). Senescence mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with a defect in telomere replication identify three additional EST genes. *Genetics* 144, 1399-1412.

Li, Y., Bjorklund, S., Kim, Y. J., and Kornberg, R. D. (1996). Yeast RNA polymerase II holoenzyme. *Methods Enzymol* 273, 172-175.

Liao, X. H., Zhang, M. L., Yang, C. P., Xu, L. X., and Zhou, J. Q. (2005). Characterization of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* telomerase core enzyme purified from yeast. *Biochem J* 390, 169-176.

Licht, J. D., and Collins, K. (1999). Telomerase RNA function in recombinant *Tetrahymena* telomerase. *Genes Dev* 13, 1116-1125.

Lichty, J. J., Malecki, J. L., Agnew, H. D., Michelson-Horowitz, D. J., and Tan, S. (2005). Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expr Purif* 41, 98-105.

Lin, J. J., and Zakian, V. A. (1996). The *Saccharomyces* CDC13 protein is a single-strand TG1-3 telomeric DNA-binding protein in vitro that affects telomere behavior in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13760-13765.

Lingner, J., Cech, T. R., Hughes, T. R., and Lundblad, V. (1997a). Three Ever Shorter Telomere (EST) genes are dispensable for in vitro yeast telomerase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11190-11195.

Lingner, J., Cooper, J. P., and Cech, T. R. (1995). Telomerase and DNA end replication: no longer a lagging strand problem? *Science* 269, 1533-1534.

Lingner, J., Hughes, T. R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V., and Cech, T. R. (1997b). Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* 276, 561-567.

Livengood, A. J., Zaug, A. J., and Cech, T. R. (2002). Essential regions of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase RNA: separate elements for Est1p and Est2p interaction. *Mol Cell Biol* 22, 2366-2374.

Lue, N. F., Lin, Y. C., and Mian, I. S. (2003). A conserved telomerase motif within the catalytic domain of telomerase reverse transcriptase is specifically required for repeat addition processivity. *Mol Cell Biol* 23, 8440-8449.

Lue, N. F., and Peng, Y. (1998). Negative regulation of yeast telomerase activity through an interaction with an upstream region of the DNA primer. *Nucleic Acids Res* 26, 1487-1494.

Lue, N. F., and Wang, J. C. (1995). ATP-dependent processivity of a telomerase activity from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 270, 21453-21456.

Lue, N. F., and Xia, J. (1998). Species-specific and sequence-specific recognition of the dG-rich strand of telomeres by yeast telomerase. *Nucleic Acids Res* 26, 1495-1502.

Lundblad, V., and Szostak, J. W. (1989). A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* 57, 633-643.

Ly, H., Calado, R. T., Allard, P., Baerlocher, G. M., Lansdorp, P. M., Young, N. S., and Parslow, T. G. (2005). Functional characterization of telomerase RNA variants found in patients with hematologic disorders. *Blood* 105, 2332-2339.

Makarov, V. L., Hirose, Y., and Langmore, J. P. (1997). Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell* 88, 657-666.

Marcand, S., Brevet, V., and Gilson, E. (1999). Progressive cis-inhibition of telomerase upon telomere elongation. *EMBO J* 18, 3509-3519.

Marcand, S., Brevet, V., Mann, C., and Gilson, E. (2000). Cell cycle restriction of telomere elongation. *Curr Biol* 10, 487-490.

Marcand, S., Wotton, D., Gilson, E., and Shore, D. (1997). Rap1p and telomere length regulation in yeast. *Ciba Found Symp* 211, 76-93.

Mattanovich, D., Gasser, B., Hohenblum, H., and Sauer, M. (2004). Stress in recombinant protein producing yeasts. *J Biotechnol* 113, 121-135.

McClintock, B. (1939). The behavior in successive nuclear divisions of a chromosome broken at meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 25, 405-416.

McClintock, B. (1941). The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* 26, 234-282.

McElligott, R., and Wellinger, R. J. (1997). The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. *EMBO J* 16, 3705-3714.

Meyerson, M., Counter, C. M., Eaton, E. N., Ellisen, L. W., Steiner, P., Caddle, S. D., Ziaugra, L., Beijersbergen, R. L., Davidoff, M. J., Liu, Q., *et al.* (1997). hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 90, 785-795.

Morin, G. B. (1989). The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 59, 521-529.

- Mozdy, A. D., and Cech, T. R. (2006). Low abundance of telomerase in yeast: implications for telomerase haploinsufficiency. *RNA* 12, 1721-1737.
- Muller, H. J. (1938). The remaking of chromosomes. *The Collecting Net* 13, 181-195, 198.
- Munoz, D. P., and Collins, K. (2004). Biochemical properties of *Trypanosoma cruzi* telomerase. *Nucleic Acids Res* 32, 5214-5222.
- Nagel, R., and Ares, M., Jr. (2000). Substrate recognition by a eukaryotic RNase III: the double-stranded RNA-binding domain of Rnt1p selectively binds RNA containing a 5'-AGNN-3' tetraloop. *RNA* 6, 1142-1156.
- Nakamura, T. M., Morin, G. B., Chapman, K. B., Weinrich, S. L., Andrews, W. H., Lingner, J., Harley, C. B., and Cech, T. R. (1997). Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 277, 955-959.
- Nugent, C. I., Hughes, T. R., Lue, N. F., and Lundblad, V. (1996). Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance. *Science* 274, 249-252.
- O'Reilly, M., Teichmann, S. A., and Rhodes, D. (1999). Telomerases. *Curr Opin Struct Biol* 9, 56-65.
- Olovnikov, A. M. (1971). Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides. *Dokl Akad Nauk SSSR* 201, 1496-1499.
- Olovnikov, A. M. (1973). A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol* 41, 181-190.
- Osterhage, J. L., Talley, J. M., and Friedman, K. L. (2006). Proteasome-dependent degradation of Est1p regulates the cell cycle-restricted assembly of telomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Struct Mol Biol* 13, 720-728.
- Peng, Y., Mian, I. S., and Lue, N. F. (2001). Analysis of telomerase processivity: mechanistic similarity to HIV-1 reverse transcriptase and role in telomere maintenance. *Mol Cell* 7, 1201-1211.

Peterson, S. E., Stellwagen, A. E., Diede, S. J., Singer, M. S., Haimberger, Z. W., Johnson, C. O., Tzoneva, M., and Gottschling, D. E. (2001). The function of a stem-loop in telomerase RNA is linked to the DNA repair protein Ku. *Nat Genet* 27, 64-67.

Petrov, A. V., Dmitriev, P. V., Sokolov, K. A., and Dontsova, O. A. (2001). A specific DNA-dependent DNA polymerase is associated with *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Biochemistry (Mosc)* 66, 1361-1367.

Prescott, J., and Blackburn, E. H. (1997). Functionally interacting telomerase RNAs in the yeast telomerase complex. *Genes Dev* 11, 2790-2800.

Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Seraphin, B. (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* 24, 218-229.

Reichenbach, P., Hoss, M., Azzalin, C. M., Nabholz, M., Bucher, P., and Lingner, J. (2003). A human homolog of yeast Est1 associates with telomerase and uncaps chromosome ends when overexpressed. *Curr Biol* 13, 568-574.

Rose, M. D., Winston, F. Hieter, P. (1990). *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual* (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Sabourin, M., Tuzon, C. T., Fisher, T. S., and Zakian, V. A. (2007). A flexible protein linker improves the function of epitope-tagged proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 24, 39-45.

Sambrook, J., Fritsh, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Sandell, L. L., and Zakian, V. A. (1993). Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss. *Cell* 75, 729-739.

Schnapp, G., Rodi, H. P., Rettig, W. J., Schnapp, A., and Damm, K. (1998). One-step affinity purification protocol for human telomerase. *Nucleic Acids Res* 26, 3311-3313.

Schramke, V., Luciano, P., Brevet, V., Guillot, S., Corda, Y., Longhese, M. P., Gilson, E., and Geli, V. (2004). RPA regulates telomerase action by providing Est1p access to chromosome ends. *Nat Genet* 36, 46-54.

Schultz, M. C. (1999). Chromatin assembly in yeast cell-free extracts. *Methods* 17, 161-172.

Seto, A. G., Livengood, A. J., Tzfati, Y., Blackburn, E. H., and Cech, T. R. (2002). A bulged stem tethers Est1p to telomerase RNA in budding yeast. *Genes Dev* 16, 2800-2812.

Seto, A. G., Umansky, K., Tzfati, Y., Zaug, A. J., Blackburn, E. H., and Cech, T. R. (2003). A template-proximal RNA paired element contributes to *Saccharomyces cerevisiae* telomerase activity. *RNA* 9, 1323-1332.

Seto, A. G., Zaug, A. J., Sobel, S. G., Wolin, S. L., and Cech, T. R. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* telomerase is an Sm small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nature* 401, 177-180.

Shampay, J., Szostak, J. W., and Blackburn, E. H. (1984). DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature* 310, 154-157.

Sharanov, Y. S., Zvereva, M. I., and Dontsova, O. A. (2006). *Saccharomyces cerevisiae* telomerase subunit Est3p binds DNA and RNA and stimulates unwinding of RNA/DNA heteroduplexes. *FEBS Lett* 580, 4683-4690.

Shippen-Lentz, D., and Blackburn, E. H. (1989). Telomere terminal transferase activity from *Euplotes crassus* adds large numbers of TTTTGGGG repeats onto telomeric primers. *Mol Cell Biol* 9, 2761-2764.

Shippen-Lentz, D., and Blackburn, E. H. (1990). Functional evidence for an RNA template in telomerase. *Science* 247, 546-552.

Singer, M. S., and Gottschling, D. E. (1994). TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science* 266, 404-409.

Snow, B. E., Erdmann, N., Cruickshank, J., Goldman, H., Gill, R. M., Robinson, M. O., and Harrington, L. (2003). Functional conservation of the telomerase protein Est1p in humans. *Curr Biol* 13, 698-704.

Stellwagen, A. E., Haimberger, Z. W., Veatch, J. R., and Gottschling, D. E. (2003). Ku interacts with telomerase RNA to promote telomere addition at native and broken chromosome ends. *Genes Dev* 17, 2384-2395.

Stevens, R. C. (2000). Design of high-throughput methods of protein production for structural biology. *Structure* 8, R177-185.

Taggart, A. K., Teng, S. C., and Zakian, V. A. (2002). Est1p as a cell cycle-regulated activator of telomere-bound telomerase. *Science* 297, 1023-1026.

Tan, S., Kern, R. C., and Selleck, W. (2005). The pST44 polycistronic expression system for producing protein complexes in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 40, 385-395.

Teixeira, M. T., Arneric, M., Sperisen, P., and Lingner, J. (2004). Telomere length homeostasis is achieved via a switch between telomerase- extendible and - nonextendible states. *Cell* 117, 323-335.

Teixeira, M. T., Forstemann, K., Gasser, S. M., and Lingner, J. (2002). Intracellular trafficking of yeast telomerase components. *EMBO Rep* 3, 652-659.

Teo, S. H., and Jackson, S. P. (2001). Telomerase subunit overexpression suppresses telomere-specific checkpoint activation in the yeast yku80 mutant. *EMBO Rep* 2, 197-202.

Terpe, K. (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 60, 523-533.

Theimer, C. A., Blois, C. A., and Feigon, J. (2005). Structure of the human telomerase RNA pseudoknot reveals conserved tertiary interactions essential for function. *Mol Cell* 17, 671-682.

Theimer, C. A., and Feigon, J. (2006). Structure and function of telomerase RNA. *Curr Opin Struct Biol* 16, 307-318.

Tzfati, Y., Fulton, T. B., Roy, J., and Blackburn, E. H. (2000). Template boundary in a yeast telomerase specified by RNA structure. *Science* 288, 863-867.

Tzfati, Y., Knight, Z., Roy, J., and Blackburn, E. H. (2003). A novel pseudoknot element is essential for the action of a yeast telomerase. *Genes Dev* 17, 1779-1788.

van Steensel, B., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (1998). TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 92, 401-413.

Vega, L. R., Mateyak, M. K., and Zakian, V. A. (2003). Getting to the end: telomerase access in yeast and humans. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 948-959.

Virta-Pearlman, V., Morris, D. K., and Lundblad, V. (1996). Est1 has the properties of a single-stranded telomere end-binding protein. *Genes Dev* 10, 3094-3104.

Watson, J. D. (1972). Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol* 239, 197-201.

Waugh, D. S. (2005). Making the most of affinity tags. *Trends Biotechnol* 23, 316-320.

Weinrich, S. L., Pruzan, R., Ma, L., Ouellette, M., Tesmer, V. M., Holt, S. E., Bodnar, A. G., Lichtsteiner, S., Kim, N. W., Trager, J. B., *et al.* (1997). Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. *Nat Genet* 17, 498-502.

Wellinger, R. J., Ethier, K., Labrecque, P., and Zakian, V. A. (1996). Evidence for a new step in telomere maintenance. *Cell* 85, 423-433.

Wellinger, R. J., and Sen, D. (1997). The DNA structures at the ends of eukaryotic chromosomes. *Eur J Cancer* 33, 735-749.

Wellinger, R. J., Wolf, A. J., and Zakian, V. A. (1993). *Saccharomyces* telomeres acquire single-strand TG1-3 tails late in S phase. *Cell* 72, 51-60.

Wong, J. M., Kusdra, L., and Collins, K. (2002). Subnuclear shuttling of human telomerase induced by transformation and DNA damage. *Nat Cell Biol* 4, 731-736.

Wright, J. H., and Zakian, V. A. (1995). Protein-DNA interactions in soluble telosomes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 23, 1454-1460.

Wright, W. E., Tesmer, V. M., Huffman, K. E., Levene, S. D., and Shay, J. W. (1997). Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev* 11, 2801-2809.

Yang, C. P., Chen, Y. B., Meng, F. L., and Zhou, J. Q. (2006). *Saccharomyces cerevisiae* Est3p dimerizes in vitro and dimerization contributes to efficient telomere replication in vivo. *Nucleic Acids Res* *34*, 407-416.

Yu, G. L., Bradley, J. D., Attardi, L. D., and Blackburn, E. H. (1990). In vivo alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated *Tetrahymena* telomerase RNAs. *Nature* *344*, 126-132.

Zahler, A. M., and Prescott, D. M. (1988). Telomere terminal transferase activity in the hypotrichous ciliate *Oxytricha nova* and a model for replication of the ends of linear DNA molecules. *Nucleic Acids Res* *16*, 6953-6972.

Zakian, V. A. (1989). Structure and function of telomeres. *Annu Rev Genet* *23*, 579-604.

Zakian, V. A. (1995). Telomeres: beginning to understand the end. *Science* *270*, 1601-1607.

Zappulla, D. C., and Cech, T. R. (2004). Yeast telomerase RNA: a flexible scaffold for protein subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 10024-10029.

Zappulla, D. C., Goodrich, K., and Cech, T. R. (2005). A miniature yeast telomerase RNA functions in vivo and reconstitutes activity in vitro. *Nat Struct Mol Biol* *12*, 1072-1077.

Zhou, J., Monson, E. K., Teng, S., Schulz, V. P., and Zakian, V. A. (2000). Pif1p helicase, a catalytic inhibitor of telomerase in yeast. *Science* *289*, 771-774.

ANNEXE 1

Larose S., Laterreur N., Ghazal G., Gagnon J., Wellinger R.J. & Abou Elela S. *RNase III-Dependent Regulation of Yeast Telomerase*. 2006. Soumis à: Journal of Biological Chemistry.

Cet article a été soumis au *Journal of Biological Chemistry*. Il traite de la protéine Rnt1p en tant que régulateur négatif de la télomérase chez *Saccharomyces cerevisiae*. Les travaux principalement menés par Stéphanie Larose ont mené à la découverte que Rnt1p clive spécifiquement une structure tige-tétraboucle dans l'ARN messager de la sous-unité Est1p. Une analyse effectuée dans une souche *rnt1Δ* a démontré que lorsque la protéine Rnt1p est absente, les niveaux d'ARN messagers codant pour les sous-unités de la télomérase augmentent. De plus, cette augmentation se traduit par une hausse en expression de la protéine Est2p ainsi qu'une augmentation de l'activité de télomérase (ce mémoire). Les résultats obtenus ont finalement démontré que Rnt1p agit de façon dépendante du cycle cellulaire sur l'ARN messager d'Est1p.

RNase III-DEPENDENT REGULATION OF YEAST TELOMERASE

**Stéphanie Larose, Nancy Laterreur, Ghada Ghazal, Jules Gagnon,
Raymund J Wellinger and Sherif Abou Elela***

**From the RNA Group, Département de Microbiologie et d'Infectiologie,
Faculté de Médecine, Université de Sherbrooke**

Sherbrooke, Québec, Canada J1H 5N4

Running title: Rnt1p is a negative regulator of yeast telomerase

Address Correspondence to: Sherif Abou Elela, Département de Microbiologie et d'Infectiologie, Université de Sherbrooke, 3001 12^e Ave Nord, Sherbrooke, Québec. Tel. (819) 564-5275; Fax. (819) 564-5392; E-Mail: sherif.abou.elela@usherbrooke.ca

In baker's yeast, *in vivo* telomerase activity requires a ribonucleoprotein (RNP) complex with at least four associated proteins (Est2p, Est1p, Est3p, and Cdc13p) and one RNA species (Tlc1). The function of telomerase in maintaining chromosome ends, called telomeres, is tightly regulated and linked to the cell cycle. However, the mechanisms that regulate the expression of individual components of telomerase are poorly understood. Here we report that yeast RNase III (Rnt1p), a dsRNA specific endoribo-nuclease, regulates the expression of telomerase subunits and is required for maintaining normal telomere length. Deletion or inactivation of *RNT1* induced the expression of Est1, Est2, Est3 and Tlc1 RNAs and increased telomerase activity leading to elongation of telomeric repeat tracts. *In silico* analysis of the different RNAs coding for the telomerase subunits revealed a canonical Rnt1p cleavage site near the 3' end of Est1 mRNA. This predicted structure was cleaved by Rnt1p and its disruption abolished cleavage *in vitro*. Mutation of the Rnt1p cleavage signal *in vivo* impaired the cell cycle dependent degradation of Est1 mRNA without affecting its steady-state level. These results reveal a new mechanism that influences telomeres length by controlling the expression of the telomerase subunits.

The ends of eukaryotic chromosomes are capped with special structures made of tandem DNA repeats and associated proteins, called telomeres. These structures protect chromosomes from end-to-end fusion, recombination and nucleolytic degradation (1,2). However, since the conventional DNA replication machinery cannot fully duplicate the ends of linear chromosomes, telomeric DNA will shorten with each round of replication, leading to a replicative senescence (3). To solve this end replication problem, most eukaryotes use the activity of an enzyme called telomerase to ensure the maintenance of telomeric DNA (4). Telomerase is a ribonucleoprotein reverse transcriptase that can extend the 3' end of chromosomes using its RNA subunit as a template for the addition of repetitive sequences.

In vitro, telomerase activity requires a reverse transcriptase (Tert, Est2p in yeast) and an RNA template (Terc, Tlc1 in yeast) (5,6). *In vivo*, yeast telomerase requires additional factors for function including Est1p, Est3p and Cdc13p (3,7). Deleting any one of the *EST1*, *EST2*, *EST3* or *TLC1* genes or a particular allele of the *CDC13* gene (*cdc13-2*) causes progressive telomere shortening leading to cellular senescence. Increased expression of individual telomerase genes

may also lead to telomeric phenotypes. For example, overexpression of Tlc1 causes telomere shortening by sequestering the Tlc1-binding factor Ku (8,9). Similarly, overexpression of Est1p may causes a slight telomere lengthening in some strains (10). On the other hand, induction of Est1, Est2 and Est3 mRNA expression in cells with defective non-sense mediated mRNA decay decreases telomere length (11). These observations suggest that variation in the expression levels of the different components of telomerase holoenzyme influences telomerase function. However, the cellular mechanisms that regulate and balance the expression of the different components of the telomerase ribonucleoprotein remain unknown.

Telomere elongation occurs in the late S or early G2/M phases of the cell cycle (12,13). There is evidence that the catalytic core of telomerase (Est2p and Tlc1) is present at yeast telomeres throughout the cell cycle but requires an association of Est1p, which accumulates in the S phase of the cell cycle (14,15). Telomerase activity on the telomeres is negatively regulated by Pif1p, a helicase that is thought to remove telomerase from the chromosome ends (16). In addition, the Rif-proteins also exert a negative role on telomere length maintenance (17) and several other proteins involved in the DNA damage checkpoint and repair pathways were shown to influence steady-state telomere length *in vivo* (18). At least some of the factors regulating telomere length influence the activity of the telomerase subunits, yet very little is known about the mechanisms regulating the expression of the telomerase subunits.

Here we show that the expression level of several telomerase subunits is regulated post-transcriptionally by yeast RNase III (Rnt1p). Rnt1p is a dsRNA specific endoribonuclease involved in the maturation of many RNAs, including snRNAs, snoRNAs and pre-rRNAs, (19-21). Recently, it was shown that Rnt1p regulates the expression of glucose-dependent genes, degrades unspliced mRNAs and cleaves mRNAs with abnormal 3' ends (22-25). The majority of Rnt1p substrates include a short RNA stem capped with an AGNN tetraloop structure (26). These particular structures are cleaved at a fixed distance from the tetraloop (27-29). Deletion of *RNT1* induced the expression of many components of telomerase, leading to an increase in telomerase activity and elongation of the telomeres. A point mutation that impairs Rnt1p's catalytic activity without affecting its expression or interaction with RNA, fails to restore normal expression of telomerase subunits or reduce telomere lengths. *In silico* analysis revealed a canonical Rnt1p cleavage site within the coding sequence of the Est1 mRNA. *In vitro* analyses showed that the predicted structure was directly cleaved by Rnt1p in the absence of other factors. Disruption of this Rnt1p cleavage site by silent mutations impaired the cell cycle dependent regulation of Est1

mRNA, suggesting that Rnt1p triggers RNA cleavage in a cell cycle dependent manner. These results demonstrate that the expression level of the telomerase subunits influences its function and reveal a new regulatory mechanism that controls the accumulation of telomerase related RNAs.

Experimental Procedures

Strains and Plasmids - All yeast strains were grown and manipulated using standard procedures (30,31). Strains W303-1A, *rnt1Δ*, *rnt1-ts* and *rnt1-D247/R* were described earlier (22,32-34). *RNT1* (NLYH15) and *rnt1Δ* (NLYH12) cells harbouring protein-A tagged *EST2* were created by crossing the strains YKF103 (MATa; *ura3-52*; *ade 2-101*; *lys2-801*; *leu2Δ1*; *trp1Δ1*; *his3-Δ200/CF+* (*TRP1 SUP11*)) (35) and DUY746 (MATα; *leu2-3,112*; *his3*; *trp1*; *pep4*; *prc1*; *HIS3::pet56::rnt1*) (D.Ursic personal communication). Strain SLY150 (*EST1-4*) was constructed by inserting 4 silent mutations (T2061/C; G2064/A; C2067/T; C2070/T) within *EST1* coding sequence in JPY112 (MATa/α; *lys2Δ0/lys2Δ0*; *ura3Δ0/ura3Δ0*; *his3Δ200/his3Δ200*; *leu2Δ0/leu2Δ0*; *RNT1/rnt1Δ::KMX4*) a derivative of BY4705. The DNA fragment used for the replacement of 4 nucleotides was created by cloning two PCR fragments in the pVZ1 vector (36). The first PCR fragment was amplified using the primers 5'-CCAGACGAAGCAATTGATGCTGACGAAGATATTACCGTCCAAGTGCC-3' and 5'-GCTGGGTACCGGGCCCCCCCCTCGAGGTCG-3'. The amplified sequence corresponds to the 3' end of *EST1* and contains 4 mutations disrupting Rnt1p cleavage site. The second PCR fragment was amplified using the primers 5'-CAGATTGTACTGAGAGTGCACC-3' and 5'-GTATTGACAGCATATATATTTGCTGTCTTGAATTTATTATGCTAATAAATAATTATGTTTTTCAAGCGCACTGTGCGGTATTTACACACC. The amplified fragment contains the sequence of *URA3* and a short sequence of *EST1* amplified. The integration of the DNA fragment in the yeast genome was selected by growth in the absence of uracil and the marker was removed by counter selection on 5-FOA (5-Fluoro-orotic acid). SLY178 (*EST1-4*; *bar1Δ::URA3*) was generated by deleting the *BAR1* gene from SLY150 as previously described (37). MLY30 strain (*bar1Δ::HIS3*) was constructed by deleting the *BAR1* gene in BY4705a strain (MATa; *ade2Δ::hisG*; *met15Δ0*; *trp1Δ63*; *lys2Δ0*; *ura3Δ0*; *his3Δ200*; *leu2Δ0*; *bar1Δ::HIS3*) (38).

In Vitro RNA Cleavage - *In vitro* cleavage reactions were performed as described previously (29). Cleavage of model RNA substrates was performed using T7 synthesized transcripts and recombinant Rnt1p (0.2 pmol) (39) in a 20 μl reaction buffer containing 150 mM KCl and

incubated 20 minutes at 30 °C. Cleavage of total RNA extracted from yeast was performed as described previously (22). Briefly, 50 µg of total RNA was incubated with 4 pmol of recombinant Rnt1p for 10 minutes at 30 °C as described for the cleavage of model substrates.

Analysis of mRNA Stability - The stability of the different mRNAs was determined after inhibiting the transcription using 10 µg/ml of thiolutin as previously described (22). Cells were grown at 26 °C to mid-log phase and the RNA was extracted at different time points after the addition of the drug. The levels of mRNA were quantified by real-time PCR using *RPR1* (pol III transcript) as an internal control. Half-lives were estimated using a single exponential decay formula $y = 100 e^{-bx}$. Thiolutin was kindly provided by Pfizer (Groton CT).

Primer Extension and Northern Blot Analysis - Primer extension was performed using a primer specific for *EST1* (5'-GGGTTGACGACGACAGGCGTGG-3') as described previously (19). Extended products were separated on a 6% denaturing polyacrylamide gel and visualized by autoradiography. Northern blot were performed as described previously (19) using 15 µg of total RNA run on a 1% denaturing agarose gel or run on a 4% polyacrylamide gel. The RNA was visualized by autoradiography using randomly labelled probes corresponding to specific genes. The RNA was quantified using InstantImager (Packard, Meriden, CT).

Real-time PCR Analysis - Synthesis of cDNA was performed using 2 µg of total RNA and SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Burlington, ON). Gene-specific primer protocol using a “Flap sequence” common to all primers was used to avoid DNA amplification during subsequent PCR amplification. The cDNA was purified with Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Nepean, ON). Q-PCR was performed on an ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems) as previously described (40). PCR reactions were done in triplicate using a 25 µl reaction volume. TaqMan probes (5' 6-FAM, 3' TAMRA) and specific primers (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) were used at a concentration of 250 nM and 900 nM respectively in a reaction buffer containing 50 mM KCl, 5.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris pH 8.0, with 0.625 U home Taq (41), 0.25 U UDG (New England Biolabs, Pickering, ON), 50 nM ROX Reference Dye (Invitrogen), 200 µM dATP/dGTP/dCTP, 400 µM dUTP (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC). Data were analyzed by the comparative threshold method. All primers and probes used for real-time PCR are listed in Table 1.

Telomere Length Analysis - Telomere length was analysed as described earlier (42). Genomic DNA was extracted from cells grown to mid-log phase. 5 µg of genomic DNA was digested with XhoI, separated on a 1% agarose gel, and transferred to a nylon membrane (Hybond N+, Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC). DNA was visualized by autoradiography with a randomly labelled telomeric probe.

Cell Cycle Synchronisation and FACS Analysis - Cells were synchronized in G1 by the addition of α -factor (Bioshop, Burlington, ON, Canada) to a final concentration of 0.5 µg/ml for 3 hours. Cells were harvested and resuspended in a fresh media containing 200 µg/ml pronase (Roche Diagnostics, Laval, QC) to release the cells from their arrest. Samples were taken at different time points to either extract the RNA or monitor the release into the cell cycle by FACS analysis as described previously (34). The RNA corresponding to the different genes was quantified by real-time PCR using Rpr1 as an internal control.

Western blot and Telomerase Activity - Telomerase activity assays were performed as previously described (35). *EST2* gene was modified to incorporate an N-terminal Protein A tag as described (35). Immunoprecipitation was performed using IgG-sepharose beads (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC) and 2 mg of total protein extracted from either *RNT1* (NLYH15) or *rnt1Δ* (NLYH12) cells. Extension of a telomeric primer (5' - TAGGGTAGTAGTAGGG - 3') was monitored to determine telomerase activity. Quantifications were performed using a Storm Phosphor Imager (Storm 860, Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC). Total proteins (30µg) or immunoprecipitated protein were run on an 8% SDS-PAGE and transferred onto Hybond-C membrane (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC). Western blots were performed using 1:7500 diluted (total proteins) or 1:5000 diluted (immunoprecipitated protein) of polyclonal rabbit anti-protein A antibodies (Sigma, Oakville, ON). Donkey anti-rabbit IgG conjugated with horseradish peroxidase was used as a secondary antibody to allow detection with ECL Plus reagents (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC). After membrane stripping, blots were incubated with mouse anti-PGK Ig diluted 1:500 (Molecular Probes, Invitrogen, Burlington, ON) and sheep anti-mouse IgG conjugated with HRP diluted 1:5000 (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC) was used as a secondary antibody. Detection and quantification were done using a Storm Fluorescence Imager (Storm 860, Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC).

RESULTS

We previously performed a microarray analysis of RNA extracted from cells lacking *RNT1* and compared it to RNA from wt cells (22). After detailed inspection of the data, we noticed that many telomerase related mRNAs were induced upon the deletion of *RNT1* (Fig. 1A). This induced expression of RNAs coding for telomerase subunits was similar to that of known Rnt1p substrates like Rps22B (23) and Mig2 (22) mRNAs. The impact of *RNT1* deletion on the expression of telomerase related RNAs was verified by Northern blot analysis. Consistent with the microarray data, the mRNAs coding for the main components of the telomerase RNP complex (Est1, Est2, Est3) and the telomerase RNA Tlc1 accumulated in the absence of Rnt1p (Fig. 1B). No major increase in the RNA amounts coding for other telomere related proteins like Cdc13, Ten1 and Tel1 were detected by Northern blot (data not shown). We conclude that Rnt1p is required for normal expression of most core telomerase subunits.

If Rnt1p influences the stability of Est1, Est2, Est3 and Tlc1 RNAs we expected the deletion of *RNT1* to slow the turnover and increase the half-life of these RNAs. In order to examine this possibility, the half-life of each affected RNA was determined in wild type and *rnt1Δ* cells after inhibiting new transcription using thiolutin. Quantitative PCR analysis was used to estimate the mRNA amounts at different time points after transcription inhibition and the half-life was calculated for each RNA species (Table 2). We used two unrelated RNAs (Spt15 and Act1) with different half-lives and which are thought not to be directly affected by Rnt1p as controls. Indeed, the half-lives of these control RNAs were only slightly longer in *rnt1Δ* cells when compared with that in wild type cells due to a general slow metabolism of *rnt1Δ* cells (Table 2 and data not shown). In contrast, these experiments showed a significant increase in the half-lives of Est1, Est2 and Est3 mRNAs (Table 2). As previously described, the Tlc1 RNA was already very stable in wild type cells (43), and no decay was observed in both wild type and *rnt1Δ* cells even after 1 hour of transcription inhibition (Table 2). When normalized to Spt15, the relative half-lives of Est1 and Est2 were about 2 times longer in *rnt1Δ* than in wild type cells, while that of Est3 was only slightly longer in *rnt1Δ* cells (Fig. 1C). If the increase in the half-life of the Est2 mRNA of about two fold was significant, it should lead to a corresponding increase in the amount of Est2p. Indeed, deleting *RNT1* in cells expressing a protein A tagged version of the telomerase catalytic subunit Est2p increased its expression by about 3 times as compared to that in wild type cells (Fig. 1D). We conclude that deletion of *RNT1* slows the decay rate of several telomerase related mRNAs leading to an increase in the expression of the telomerase subunits.

To evaluate the impact of Rnt1p on telomerase function, we examined telomere length in wild type and *rnt1Δ* cells by Southern blotting. DNA was extracted from relevant strains and digested with the restriction enzyme XhoI. Due to a conserved XhoI site in the telomere-proximal Y'-element, many terminal restriction fragments (TRFs) appear as somewhat smeary bands of about 1.2 kb size on such blots (44). In the absence of Rnt1p the size of the TRFs increased when compared with that of wild type cells, indicating that the deletion of *RNT1* increases telomere length (Fig. 2A). This increase in telomere length is directly linked to the expression of Rnt1p, since transformation of *rnt1Δ* cells with a plasmid harbouring *RNT1* restores normal telomere length (Fig. 2A).

We next examined whether this increase in telomere length is associated with an increase in telomerase activity. Relative telomerase activity was assessed in extracts derived from wild type and *rnt1Δ* cells expressing a protein A tagged version of Est2p. In this procedure, telomerase was partially purified using IgG-sepharose beads and used for a direct extension of a telomeric primer (44). As shown in Figure 2B, deletion of *RNT1* resulted in an increase in relative telomerase activity (RTA) as compared with the internal control (Fig. 2B). The observed activity is telomerase specific, since it is RNA dependent and was not observed in precipitates from untagged cells. The observed increase in the telomerase activity is Rnt1p-dependent but strain background-independent and was also observed after the inactivation of a temperature sensitive allele of *RNT1* (data not shown). Thus, the accumulation of the RNAs of telomerase core subunits upon the deletion of Rnt1p leads to an increase in both its *in vitro* activity and telomere length.

Deletion of Rnt1p affects many cellular pathways and slows cell metabolism (34). To ensure that the increased levels of RNA of telomerase subunits is not a secondary effect generated by long term changes in cell metabolism, we monitored the kinetics of telomerase induction upon inactivating a temperature sensitive allele of Rnt1p (*rnt1-ts*) (22). If the RNAs coding for the telomerase subunits are targets of Rnt1p-mediated RNA metabolism, their steady-state levels should change with the same kinetics at that of known Rnt1p substrates (e.g. snoRNAs). Total RNA was extracted from *rnt1-ts* cells at different intervals after shift to the restrictive temperature (37°C). The extracted RNA was analyzed using Northern blot or real-time PCR. As expected, Northern blots using a probe specific to snR43, a known substrate of Rnt1p, documented a processing defect already two hours after shift to 37°C (Fig. 3A). Real-time PCR analysis of the same RNA samples indicated that similar to snR43, the levels for RNAs coding for the telomerase subunits increased 2 hours after shift to the restrictive temperature (Fig. 3B). Est2 mRNA level

increased very fast after the inactivation of Rnt1p, while the Tlc1 RNA accumulated somewhat more slowly. The steady-state amount Act1 mRNA increases about two times upon the deletion of Rnt1p, but this increase is thought to be due to indirect effects on overall cell metabolism and a reduction in the amount of mature rRNA in such cells. Strikingly, the kinetics of mRNA accumulation for actin upon Rnt1p inactivation was very different than that observed with the telomerase associated RNAs. Even after 8 hours after the shift to the restrictive temperature, there was no detectable increase in Act1 mRNA (22, and data not shown). Given the similarities in the kinetics of the increases of telomerase subunit RNAs with those of the accumulation of non-processed *bona fide* Rnt1p substrates, the data suggest that Est1, Est2, Est3, and Tlc1 RNAs are targets of Rnt1p-controlled RNA metabolism.

Rnt1p is an endoribonuclease that could influence the RNA levels of telomerase subunits by directly cleaving the respective RNAs thereby accelerating their degradation. To test this possibility, we monitored the impact on the expression of the telomerase subunits of a point mutation in *RNT1* (D247/R), which leads to an impaired Rnt1p RNA-cleavage activity without affecting other functions (45,46). Total RNA was extracted from wild type, *rnt1Δ* or *rnt1-D247/R* cells and analyzed using Northern blots. As shown in Figure 3C, RNAs extracted from *rnt1Δ* and *rnt1-D247/R* cells exhibit similar increases in the mRNAs of telomerase subunits when compared to wild type cells. We conclude that the RNA cleavage activity of Rnt1p is required for the regulation of normal expression levels of telomerase subunits.

Most Rnt1p substrates exhibit a short RNA stem capped with a terminal AGNN tetraloop (27-29). We exploited this feature to search for potential Rnt1p substrates within the RNAs coding for telomerase subunits. This *in silico* search was performed using a previously established strategy that scores potential substrates based on similarity to known cleavage signals and other overall structural features (47). One stem-loop structure with high similarity to known substrates was predicted within the coding sequence of Est1 mRNA near its 3' end (Fig. 4A). A model RNA representing the predicted cleavage signal was synthesized *in vitro* and tested for cleavage using purified recombinant Rnt1p. As shown in Figure 4B, the Est1 RNA structure is cleaved by Rnt1p *in vitro* at the predicted distance from the tetraloop and mutations that disrupt the formation of the stem-loop structure (Est1-4) abolished the cleavage. We also tested the capacity of Rnt1p to cleave the predicted structure in the context of the mRNA isolated from cells. Total RNA was extracted from wild type cells or cells expressing a version of Est1 mRNA (*EST1-4*) carrying silent mutations that disrupt the Rnt1p cleavage signal (Fig. 4A). The RNA was incubated with

purified recombinant enzyme and the cleavage was detected by either Northern blot or primer extension. As shown in Figure 4C, Est1 mRNA is cleaved by Rnt1p, releasing a product of approximately 2000 nucleotides, consistent with the cleavage of the predicted structure, while the mRNA for Est1-4 was not cleaved. Primer extension analysis mapped the cleavage sites of Rnt1p at 14 and 16 bp from the stem-loop as predicted (data not shown). Examination of *EST1* sequence from other species revealed the presence of a potential Rnt1p cleavage site in all *Saccharomyces* species where the enzyme specificity is conserved (data not shown). To ensure that our *in silico* search did not miss any potential cleavage sites, we performed a similar *in vitro* cleavage assay on the RNAs coding for the other components of telomerase. This analysis did not reveal any Rnt1p-specific cleavage *in vitro* (data not shown). This suggests that Est2, Est3 and Tlc1 RNAs do not contain canonical Rnt1p cleavage sites but does not exclude the possibility that these RNAs are cleaved by Rnt1p using an alternative mechanism *in vivo*. We conclude that the mRNA coding for Est1p is a direct substrate of Rnt1p.

Most known mRNAs substrates of Rnt1p are cleaved by this enzyme in response to variation in growth conditions or cellular signals (22,24). Therefore, we presumed that the cleavage of the Est1 RNA *in vivo* might also be triggered by a specific signal. The function of Est1p is cell cycle phase specific and there is evidence that the protein is associated with active telomerase at the telomeres during late-S phase (14). A small reduction of Est1 mRNA expression has also been observed in G1-arrested cells (48). We therefore hypothesized that Est1 mRNA stability is regulated in a cell cycle and Rnt1p dependent manner. To test this hypothesis, we monitored the expression level of the Est1 mRNA during the cell cycle using synchronized cell cultures of wt cells (*EST1*; *bar1Δ*) and cells expressing the version of Est1 mRNA that is not cleaved by Rnt1p (*EST1-4*; *bar1Δ*). *EST1*; *bar1Δ* and *EST1-4*; *bar1Δ* cells were synchronized in the G1 phase of the cell cycle with α -factor and after release, cell cycle progression was monitored by FACS analysis (data not shown). Total RNA was extracted at each time point from the synchronized cultures and analyzed by Northern blot (Fig. 5A). The relative mRNA levels were determined using real-time PCR (Fig. 5B). As expected, the cell cycle regulated gene *CLN2* mRNA (49) displayed similar expression patterns in both *EST1*; *bar1Δ* and *EST1-4*; *bar1Δ* cells and its expression in both cases was tightly linked to the cell cycle progression (Fig. 5A and 5B and data not shown). Also consistent with previous results, we found that the expression of Est1 mRNA in *EST1*; *bar1Δ* cells follows the cell cycle dependent expression pattern of Cln2 mRNA (49). Est1 mRNA was least expressed in G1 phase as expected (48) and most expressed in the S phase of the cell cycle. This result is consistent with the model suggesting that Est1p function is

required for telomerase activity at the end of S-phase (14). The cell cycle dependent induction of Est1-4 mRNA, which carries mutations disrupting Rnt1p cleavage site, was similar to that of the Est1 mRNA. However, at the end of the S phase, more Est1-4 mRNA than Est1 mRNA was detected. As observed in Figure 5C, the highest detected Est1 RNA value was similar in *EST1;bar1Δ* and *EST1-4;bar1Δ* strains while the lowest Est1 RNA value was significantly higher in *EST1-4;bar1Δ* strain compared to *EST1;bar1Δ*. As expected, no difference was observed for Cln2 mRNA between the two strains. We conclude that the identified Rnt1p cleavage of the Est1 mRNA contributes to efficient cell cycle dependent repression of Est1 mRNA.

DISCUSSION

In this study, we show that yeast RNase III negatively regulates the expression of yeast telomerase subunits and contributes to the cell cycle regulation of Est1 mRNA. The decreased decay rates and increased steady-state levels of the RNAs lead to an increase in telomerase activity and to telomere elongation (Fig. 1, 2). The catalytic endoribonucleolytic activity of Rnt1p was required for controlling the expression of the telomerase RNP complex, suggesting that Rnt1p targets one or more telomerase related RNA for direct cleavage (Fig. 3). Indeed, recombinant Rnt1p cleaved Est1 mRNA *in vitro* and mutations that disrupt Rnt1p cleavage impaired the cell cycle repression of Est1 mRNA without affecting the decay of other cell cycle regulated RNA (Fig. 4 and 5). These results reveal a new layer of regulation that controls telomere length by adjusting the expression of telomerase subunits and identify new targets for eukaryotic RNase III.

Efforts to understand how telomere length is regulated revealed a cell cycle controlled machinery that encompasses competing telomere elongation and shortening factors (50,51). However, very little is known about how the expression of telomerase itself is regulated and what impact variations in the expression levels may have on the telomere length. Earlier studies indicated that the expression levels of individual components of the telomerase RNA complex are not interdependent since the overexpression of any single factor appears not to alter the expression of the others (9,52,53). It was proposed that an increase in the telomerase activity requires increased expression of at least the majority of the components of the telomerase RNP complex (52). However, conditions that change these expression levels accordingly and factors that regulate them were not identified thus far. The present study identifies Rnt1p as such a factor. The increase in the telomerase activity upon the deletion of *RNT1* is not a generic response to

general perturbation in RNA metabolism (Fig. 3). In addition, previous studies have shown that mutations inhibiting nonsense-mediated mRNA decay (NMD) induces the expression of Est1, Est2 and Est3 mRNAs but, unlike the deletion of *RNT1*, it leads to short telomeres probably because it fails to induce the expression of the non-coding Tlc1 RNA (11). The simultaneous induction of the different telomerase subunits RNAs in the absence of *RNT1* indicates that either Rnt1p controls the expression of each RNA independently or it induces the expression of a single RNA that in turn induces the others. We prefer the first possibility because expressing the subunit RNAs individually from a heterologous and repressible promoter did not affect the expression of the other subunits (Larose et al., unpublished observation). Consistently, a mutation that only disrupts Rnt1p cleavage of Est1 mRNA does not increase the expression of the other components of the telomerase holoenzyme (data not shown).

The results thus raise the question of how Rnt1p exerts this negative regulation on the expression levels of the mRNAs coding for telomerase subunits. One possibility is that Rnt1p simultaneously cleaves Est1, Est2, Est3 and Tlc1 RNAs in the cell nucleus, before they are exported to the cytoplasm (54). This is supported by the fact that the catalytic activity of Rnt1p is required for the normal expression of all four RNAs and that the response of these RNAs to the inactivation of Rnt1p follows the same kinetics as that of known substrates. Moreover, our data do show that Est1 mRNA can directly be cleaved by Rnt1p *in vitro* (Fig. 4). Our failure to detect such direct cleavage of Est2, Est3, and Tlc1 RNAs could be explained if those RNAs require additional cellular factors for cleavage. It was previously shown that chaperones may mediate the cleavage of non-canonical substrates of Rnt1p (55). For example, processing of the snoRNA U18 is Rnt1p-dependent *in vivo* but recombinant Rnt1p alone does not cleave pre-U18 snoRNA *in vitro* (55). Such an *in vitro* cleavage of pre-U18 requires the presence of Nop1p, a nucleolar protein that associates with U18. It is therefore possible that yet to be identified proteins mediate the cleavage of Est2, Est3, and Tlc1 by Rnt1p in a U18-like fashion. Another possibility is that Rnt1p cleaves another RNA that will affect telomerase mRNA level. Since the catalytic activity of Rnt1p is required for normal telomerase mRNA level, that possibility could be envisaged but no such example has been observed yet.

The discovery that Rnt1p directly cleaves Est1 mRNA adds to a growing list of substrates that include mRNAs coding for glucose and iron related proteins (22,24). To date, yeast is the only eukaryote in which direct cleavage of mRNAs by RNase III enzymes is documented. In vertebrates, conditional mRNA degradation is normally carried out by the machinery of RNA

interference in the cytoplasm (56,57). The fact that Rnt1p is localized in the nucleus suggests that it cleaves its target mRNAs in the nucleoplasm, which raises questions about the function of this cleavage and its contribution to the overall regulation of gene expression (34). Nascent mRNAs are exported rapidly to the cytoplasm and at any given time, the bulk of cellular mRNAs are found in the cytoplasm (54). This explains why deletion of *RNT1* or disruption of Rnt1p cleavage activity does not dramatically increase the half-life of its target RNAs. Similarly, a disruption of its cleavage site in the targeted RNA, like in the case of the Est1-4, does not lead to a major increase in the RNA steady state level. This observation is consistent with those made in previous studies using other Rnt1p mRNA targets (22,24). It is therefore unlikely that the function of Rnt1p cleavage is to fully silence the expression of *EST1* or similarly regulated genes. Instead, Rnt1p-dependent cleavage may provide a fail-safe mechanism for programmed transcription inhibition or act as a fine tune for gene expression. Indeed, expressing the genes coding for telomerase subunits from heterologous promoters dramatically increases their expression in a Rnt1p-dependent manner (Larose et al., unpublished observation).

It is known that the abundance of Est1p is cell cycle regulated (14). Consistent with recent results (48) and with previous genome-wide transcriptional profiling (49), we show here that this is accompanied by a cell cycle dependent regulation of the mRNA coding for Est1p. A significant increase of Est1 mRNA was observed during the transition from the G1 to the S phase of the cell cycle which correlates with the increase of the protein level observed in S phase (14). After S-phase and when cells enter G2, the level of Est1 mRNA rapidly decreased (Fig. 5). It is noteworthy that the normally strictly nucleolar localization of Rnt1p is relaxed exactly at this point in the cell cycle such that the enzyme is found throughout the nucleus in G2/M (34). This cell cycle regulated control of Rnt1p localization could thus be responsible for the cell cycle dependent degradation of the Est1 mRNA. A similar such case was previously demonstrated for the endoribonuclease MRP: the exit of this enzyme from the nucleolus allows the cleavage of the cell cycle regulated Clb2 mRNA (58). The G1/S phase dependent increase in Est1 mRNA therefore occurs when Rnt1p is sequestered in the nucleolus and consequently is unchanged, even if Rnt1p cleavage site is disrupted in the Est1-4 mRNA. This implies that transcription of *EST1* itself is induced in a cell cycle dependent manner and corroborates the inclusion of this gene in the list of G1/S induced genes that encompasses several DNA-replication genes (49). The G2-dependent decrease of Est1 mRNA level was not blocked by the deletion of *RNT1*, suggesting that normal decay of the mRNA combined with reduced transcription contribute to Est1 repression.

Therefore, our results indicate that telomerase activity in yeast is regulated by a combination of transcriptional and posttranscriptional events.

REFERENCES

1. Hug, N., and Lingner, J. (2006) *Chromosoma*
2. LeBel, C., and Wellinger, R. J. (2005) *J Cell Sci* **118**(Pt 13), 2785-2788
3. Lundblad, V., and Szostak, J. W. (1989) *Cell* **57**(4), 633-643
4. Greider, C. W., and Blackburn, E. H. (1985) *Cell* **43**(2 Pt 1), 405-413
5. Cohn, M., and Blackburn, E. H. (1995) *Science* **269**(5222), 396-400
6. Lingner, J., Cech, T. R., Hughes, T. R., and Lundblad, V. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(21), 11190-11195
7. Lendvay, T. S., Morris, D. K., Sah, J., Balasubramanian, B., and Lundblad, V. (1996) *Genetics* **144**(4), 1399-1412
8. Singer, M. S., and Gottschling, D. E. (1994) *Science* **266**(5184), 404-409
9. Peterson, S. E., Stellwagen, A. E., Diede, S. J., Singer, M. S., Haimberger, Z. W., Johnson, C. O., Tzoneva, M., and Gottschling, D. E. (2001) *Nat Genet* **27**(1), 64-67
10. Virta-Pearlman, V., Morris, D. K., and Lundblad, V. (1996) *Genes Dev* **10**(24), 3094-3104
11. Dahlseid, J. N., Lew-Smith, J., Lelivelt, M. J., Enomoto, S., Ford, A., Desruisseaux, M., McClellan, M., Lue, N., Culbertson, M. R., and Berman, J. (2003) *Eukaryot Cell* **2**(1), 134-142
12. Diede, S. J., and Gottschling, D. E. (1999) *Cell* **99**(7), 723-733
13. Marcand, S., Brevet, V., Mann, C., and Gilson, E. (2000) *Curr Biol* **10**(8), 487-490
14. Taggart, A. K., Teng, S. C., and Zakian, V. A. (2002) *Science* **297**(5583), 1023-1026
15. Taggart, A. K., and Zakian, V. A. (2003) *Curr Opin Cell Biol* **15**(3), 275-280
16. Boule, J. B., Vega, L. R., and Zakian, V. A. (2005) *Nature* **438**(7064), 57-61
17. Wotton, D., and Shore, D. (1997) *Genes Dev* **11**(6), 748-760

18. d'Adda di Fagagna, F., Teo, S. H., and Jackson, S. P. (2004) *Genes Dev* **18**(15), 1781-1799
19. Abou Elela, S., and Ares, M., Jr. (1998) *Embo J* **17**(13), 3738-3746
20. Abou Elela, S., Igel, H., and Ares, M., Jr. (1996) *Cell* **85**(1), 115-124
21. Chanfreau, G., Elela, S. A., Ares, M., Jr., and Guthrie, C. (1997) *Genes Dev* **11**(20), 2741-2751
22. Ge, D., Lamontagne, B., and Elela, S. A. (2005) *Curr Biol* **15**(2), 140-145
23. Danin-Kreiselman, M., Lee, C. Y., and Chanfreau, G. (2003) *Mol Cell* **11**(5), 1279-1289
24. Lee, A., Henras, A. K., and Chanfreau, G. (2005) *Mol Cell* **19**(1), 39-51
25. Zer, C., and Chanfreau, G. (2005) *J Biol Chem* **280**(32), 28997-29003
26. Lebars, I., Lamontagne, B., Yoshizawa, S., Aboul-Elela, S., and Fourmy, D. (2001) *Embo J* **20**(24), 7250-7258
27. Chanfreau, G., Buckle, M., and Jacquier, A. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7), 3142-3147
28. Nagel, R., and Ares, M., Jr. (2000) *Rna* **6**(8), 1142-1156
29. Lamontagne, B., Ghazal, G., Lebars, I., Yoshizawa, S., Fourmy, D., and Elela, S. A. (2003) *J Mol Biol* **327**(5), 985-1000
30. Guthrie, C., and Fink, G. R. (1991) *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*, Academic Press, San Diego, CA
31. Rose, M. D., Winston, F., and Hieter, P. (1990) *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual*, Cold Spring Harbor, New York
32. Chanfreau, G., Rotondo, G., Legrain, P., and Jacquier, A. (1998a) *Embo J* **17**(13), 3726-3737
33. Thomas, B. J., and Rothstein, R. (1989) *Cell* **56**(4), 619-630
34. Catala, M., Lamontagne, B., Larose, S., Ghazal, G., and Elela, S. A. (2004) *Mol Biol Cell* **15**(7), 3015-3030
35. Friedman, K. L., and Cech, T. R. (1999) *Genes Dev* **13**(21), 2863-2874
36. Henikoff, S., and Eghtedarzadeh, M. K. (1987) *Genetics* **117**(4), 711-725
37. Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., and Boeke, J. D. (1998) *Yeast* **14**(2), 115-132

38. Larrivee, M., LeBel, C., and Wellinger, R. J. (2004) *Genes Dev* **18**(12), 1391-1396
39. Lamontagne, B., and Abou Elela, S. (2001) *Purification and characterization of Saccharomyces cerevisiae Rnt1p nuclease*, Academic Press, San diego, CA
40. Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., and Mathieu, C. (2001) *Methods* **25**(4), 386-401
41. Engelke, D. R., Krikos, A., Bruck, M. E., and Ginsburg, D. (1990) *Anal Biochem* **191**(2), 396-400
42. Wellinger, R. J., Wolf, A. J., and Zakian, V. A. (1993) *Cell* **72**(1), 51-60
43. Chapon, C., Cech, T. R., and Zaug, A. J. (1997) *Rna* **3**(11), 1337-1351
44. LeBel, C., Larrivee, M., Bah, A., Laterreur, N., Lvesque, N., and Wellinger, R. J. (2006) *Methods Mol Biol* **313**, 265-316
45. Lamontagne, B., Hannoush, R. N., Damha, M. J., and Abou Elela, S. (2004) *J Mol Biol* **338**(2), 401-418
46. Tremblay, A., Lamontagne, B., Catala, M., Yam, Y., Larose, S., Good, L., and Elela, S. A. (2002) *Mol Cell Biol* **22**(13), 4792-4802
47. Ghazal, G., Ge, D., Gervais-Bird, J., Gagnon, J., and Abou Elela, S. (2005) *Mol Cell Biol* **25**(8), 2981-2994
48. Osterhage, J. L., Talley, J. M., and Friedman, K. L. (2006) *Nat Struct Mol Biol* **13**(8), 720-728
49. Spellman, P. T., Sherlock, G., Zhang, M. Q., Iyer, V. R., Anders, K., Eisen, M. B., Brown, P. O., Botstein, D., and Futcher, B. (1998) *Mol Biol Cell* **9**(12), 3273-3297
50. Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2004) *Annu Rev Biochem* **73**, 177-208
51. Evans, S. K., and Lundblad, V. (2000) *J Cell Sci* **113 Pt 19**, 3357-3364
52. Teo, S. H., and Jackson, S. P. (2001) *EMBO Rep* **2**(3), 197-202
53. Snow, B. E., Erdmann, N., Cruickshank, J., Goldman, H., Gill, R. M., Robinson, M. O., and Harrington, L. (2003) *Curr Biol* **13**(8), 698-704
54. Das, B., Butler, J. S., and Sherman, F. (2003) *Mol Cell Biol* **23**(16), 5502-5515
55. Giorgi, C., Fatica, A., Nagel, R., and Bozzoni, I. (2001) *Embo J* **20**(23), 6856-6865.

- 56. Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., and Bartel, D. P. (2000) *Cell* **101**(1), 25-33
- 57. Yang, D., Lu, H., and Erickson, J. W. (2000) *Curr Biol* **10**(19), 1191-1200
- 58. Gill, T., Cai, T., Aulds, J., Wierzbicki, S., and Schmitt, M. E. (2004) *Mol Cell Biol* **24**(3), 945-953
- 59. Zuker, M. (2003) *Nucleic Acids Res* **31**(13), 3406-3415

FOOTNOTES

We thank K. Friedmann for strain YKF103, D. Ursic for strain DUY746, J. Parenteau for strain JPY112, V. Lundblad for plasmid pVL145. We also thank J. Gervais-Bird for bioinformatics support. This work was supported by grant # MOP-67162 and MOP-74438 from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR). S. A. is a Chercheur-Boursier Senior and R.J.W. a Chercheur National of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

TABLES

Table1. Primers and Probes used for Real-Time PCR	
Name	Sequence
Primer EST1 For RTP	CTGCATTAAAGTATCATTCAGGTAA
Primer EST1 Rev RTP	GATAAATAATGTGCCGGATCCCGAGTTGTAAACATAAGATCGAAA
Probe EST1 RTP	TCCCATTGTGGCAGCCAAGTT
Primer EST2 For RTP	AACAGACCAACAGCAAGTGA
Primer EST2 Rev RTP	GATAAATAATGTGCCGGATCCTCTCTATTGGCTTTCGCATTA
Probe EST2 RTP	TCCGCCCATGGCAAGCTTT
Primer EST3 For RTP	GCTTGACCAAGCAGGACTTA
Primer EST3 Rev RTP	GATAAATAATGTGCCGGATCCTCTTATCGATGCGTATACCTTGTA
Probe EST3 RTP	ACCGCATATGAGCCCGACAATT
Primer SPT15 For RTP	AAACATTGTGGCAACTGTGA
Primer SPT15 Rev RTP	GATAAATAATGTGCCGGATCCAATACGCATGATGACAGCAG
Probe SPT15 RTP	TGCGCTACATGCCCCGTAATGC
Primer RPR1 For RTP	TTGTTCCGTTTGACTTGTCTG
Primer RPR1 Rev RTP	GATAAATAATGTGCCGGATCCTGGAACAGCAGCAGTAATCG
Probe RPR1 RTP	AGACCTTGACGCTCACGCCGT
Primer ACT1 For RTP	TCCGGTGATGGTGTACTCA
Primer ACT1 Rev RTP	GATAAATAATGTGCCGGATCCATTCTCAAAATGGCGTGAGG
Probe ACT1 RTP	CGTCGTTCCAATTTACGCTGGTTT
Primer CLN2 For RTP	TAACAGCAATAACGCAACCA
Primer CLN2 Rev RTP	GATAAATAATGTGCCGGATCCGGAACATTCCATGGTTAATGA
Probe CLN2 RTP	CCGCAACGGCGCATTACCT
Primer FLAP	GATAAATAATGTGCCGGATCC

Table 2. Half-lives of Different Telomerase mRNA Components^a

Strain	<i>RNT1</i>	<i>rnt1Δ</i>
Gene Name	Aver. 1/2 Life (min.)	Aver. 1/2 Life (min.)
<i>EST1</i>	10.8 ± 0.6	31.2 ± 5.5
<i>EST2</i>	7.2 ± 1.2	22.1 ± 6.2
<i>EST3</i>	17.9 ± 3.6	34.5 ± 5.7
<i>TLC1</i>	> 60.0	> 60.0
<i>SPT15</i>	12.4 ± 2.3	18.7 ± 3.8

^a mRNA half-lives were determined by real-time PCR quantification of RNA extracted from thiolutin-treated cells as described in Experimental Procedures. The values represent an average of three independent experiments. Spt15 mRNA is used as a negative control.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Deletion of *RNT1* causes an increase in the steady-state level of RNAs of telomerase subunits. (A) Illustration of the expression profiles of telomerase related mRNAs upon the deletion of *RNT1*. The data were extracted from a previously performed microarray analysis using RNA extracted from wild type or *rnt1Δ* cells (22). Mig2 and Rps22B mRNAs are shown as positive controls, while Act1 mRNA is shown as a negative control. (B) Northern blot analysis of RNAs coding for the telomerase RNP complex. Total RNA was extracted from wild type or *rnt1Δ* cells and visualized using gene specific randomly labelled probes. The RNA expression level was quantified using Instant Imager and the relative mRNA amount (RMA) was calculated using Act1 mRNA as reference. The RMA indicated below each gel is an average of three experiments with a standard deviation of ± 0.2 or less. (C) Graphical representation of the relative increases in the half-lives of the telomerase mRNAs upon the deletion of *RNT1*. The relative increase in the half-lives of the telomerase mRNAs was normalized to the half-life of Spt15 mRNA, which serves as a control for possible indirect effects caused by the slow metabolism of *rnt1Δ* cells. The different half-live values used to calculate the relative increase are indicated in Table 2. The data were obtained from three independent transcription inhibition experiments. (D) Western blot analysis of Est2p expression. Total proteins were extracted from wild type or *rnt1Δ* cells expressing proA-*EST2*. Immunoprecipitation was performed using IgG-sepharose beads. Proteins from total extract (upper panel) or from immunoprecipitation (lower panel) were separated using SDS-PAGE and Est2p was visualized using antibodies against the protein A. The expression level of Est2p was normalized to the IgG heavy chains or to Pgk1p. The relative protein amount (RPA) is an average of three experiments with a standard deviation of ± 0.6 .

Figure 2. Rnt1p is required for normal telomerase activity. (A) Southern blot analysis of telomere length. Genomic DNA was extracted from wild type or *rnt1Δ* cells and digested with XhoI restriction enzyme to release the terminal restriction fragment (TRF). The DNA was separated on a 1% agarose gel, transferred to a nylon membrane and visualized with a randomly labelled telomeric probe. Note that this experiment was repeated several times using different clones and strain backgrounds and the increase in the telomere length was reproducible for each clone and not due to clonal variation. (B) *In vitro* assay of the telomerase activity. Telomerase was partially purified by immunoprecipitating proA-*EST2* using IgG affinity chromatography. RNA dependent extension of a telomeric primer was

monitored using denaturing PAGE. The increase in the relative telomerase activity (RTA) was calculated using the activity of the wild type telomerase as a reference. The data were obtained from three independent experiments using three independent cell extracts with a standard deviation of ± 0.8 .

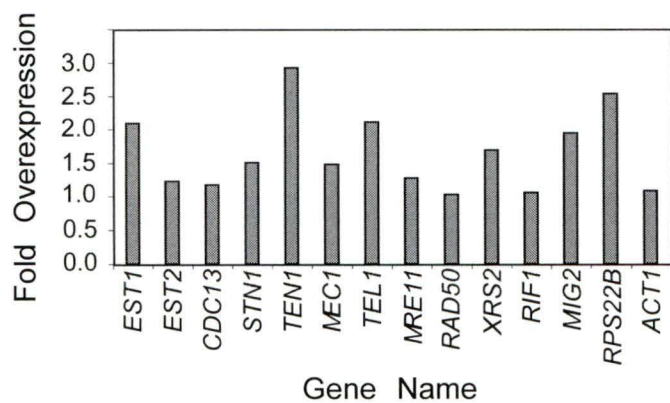
Figure 3. Rnt1p catalytic activity is required for the normal expression of the telomerase subunits. (A) Northern blot analysis of H/ACA snoRNA in cells expressing Rnt1p temperature sensitive allele (*rnt1-I338/T*). RNA was extracted from *rnt1-I338/T* cells at different intervals after shift to 37°C. A radiolabeled probe against *snR43* was used to detect both mature and extended species as indicated on the right. (B) Graphical representation of the relative increase in mRNA levels of different telomerase components in cells expressing Rnt1p TS allele (*rnt1-I338/T*). RNA was extracted as described in A and quantified using real-time PCR. The levels of the different mRNAs are presented relative to that of Act1. The indicated values represent an average of three independent experiments. (C) Comparison between the expression levels of the telomerase related RNAs in wild type cells, *rnt1Δ* cells, and cells expressing a catalytically impaired version of Rnt1p (*rnt1-D247/R*). The RNA was analyzed by Northern blot gene specific probes. Expression levels were quantified using Instant Imager and normalized to Act1 mRNA as a loading control. The indicated values represent an average of three independent experiments with a standard deviation of ± 0.4 or less.

Figure 4. Rnt1p directly cleaves Est1 mRNA using a conserved cleavage signal. (A) Schematic representation of Rnt1p's cleavage signal at the 3' end of *EST1* mRNA. The RNA structure was predicted *in silico* using Mfold (59). The predicted cleavage sites of Rnt1p are indicated by arrows. P1 and P2 indicate the cleavage products observed *in vitro*. The boxed letters indicate the mutations that disrupt Rnt1p cleavage signals. The underlined letters indicate the position of the third nucleotide in the codon of Est1 open reading frame near the tetraloop recognized by Rnt1p. Bold italic nucleotides represent the 5' and 3' ends of the synthetic substrate used for *in vitro* cleavage assay in Figure 4 (B). The nucleotide highlighted in grey was introduced to stabilize the synthetic substrate. (B) *In vitro* cleavage of a model Est1 substrate. Model RNA substrate representing the predicted Rnt1p cleavage site within the coding sequence of the Est1 mRNA (EST1) or a version carrying mutations disrupting Rnt1p recognition site (EST1-4) were T7 transcribed and incubated *in vitro* with (+) or without (-) recombinant Rnt1p enzyme in the presence of 150 mM KCl and Mg^{2+} at 30°C.

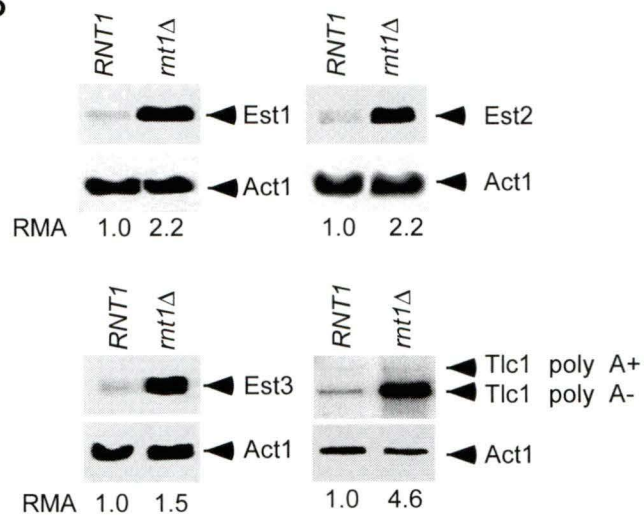
The position of the substrate (S) and the products (P1, P2) are indicated on the right. The position of the 10 bp ladder (M) is indicated on the left. (C) Cleavage of total RNA extracted from wild type cells (*RNT1*; *EST1*) or cells expressing a version of Est1 mRNA carrying the 4 silent mutations (indicated in A) that disrupt the tetraloop structure (*RNT1*; *EST1-4*). RNA was incubated with (+) or without (-) recombinant Rnt1p enzyme as described in B. The position of the full length mRNA and the 5' end cleavage product (P) are indicated on the right. The position of the predicted cleavage site was confirmed by primer extension (data not shown) and indicated in panel A.

Figure 5. Deletion of Rnt1p impair the cell cycle dependent degradation of Est1 mRNA. (A) Northern blot analysis of Cln2, Est1 and Act1 mRNAs in cell-cycle synchronized *EST1*; *bar1Δ* and *EST1-4*; *bar1Δ* cells. Cells were synchronized in G1 by the addition of α -factor and released into a synchronous S-phase. Total RNA was extracted at the indicated time points after release and visualized using gene specific randomly labelled probes. (B) Analysis of Cln2 and Est1 mRNA expression profile after release of *EST1*; *bar1Δ* (Δ) and *EST1-4*; *bar1Δ* (\square) cells. RNA was extracted from cells synchronized and released shown in A. Quantifications of mRNA levels were performed using real-time PCR as explained in Materials and Methods. The data are an average of two experiments for *EST1*; *bar1Δ* and three experiments for *EST1-4*; *bar1Δ* cells. The graph curves were obtained by a non linear regression analysis, using the simplest statistically valid model to determine the best curve fit. (C) Comparison between the highest and lowest RNA values of Est1 and Cln2 mRNAs in *EST1*; *bar1Δ* and *EST1-4*; *bar1Δ* cells. The highest and lowest RNA values of Est1 and Cln2 mRNAs were determined directly from the curves shown in B.

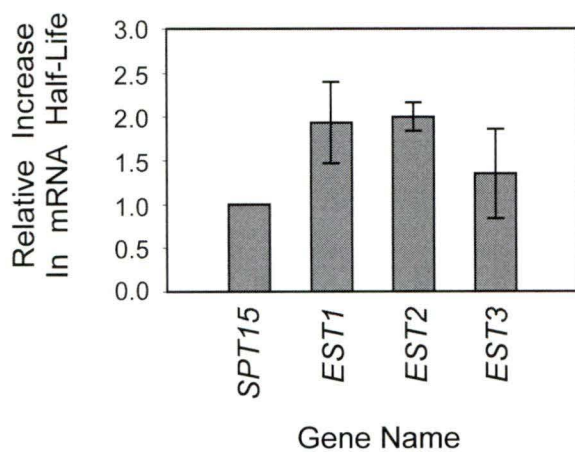
A



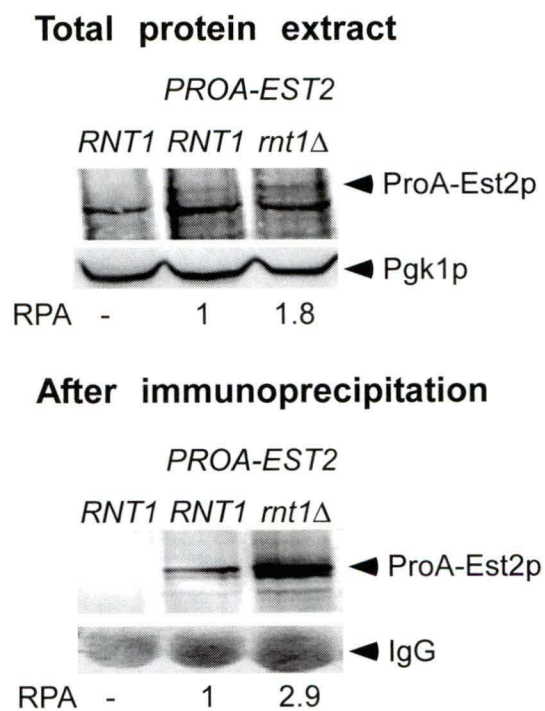
B



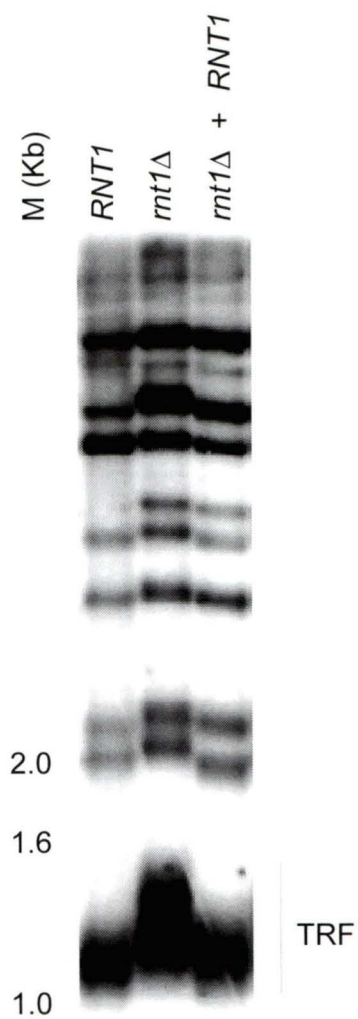
C



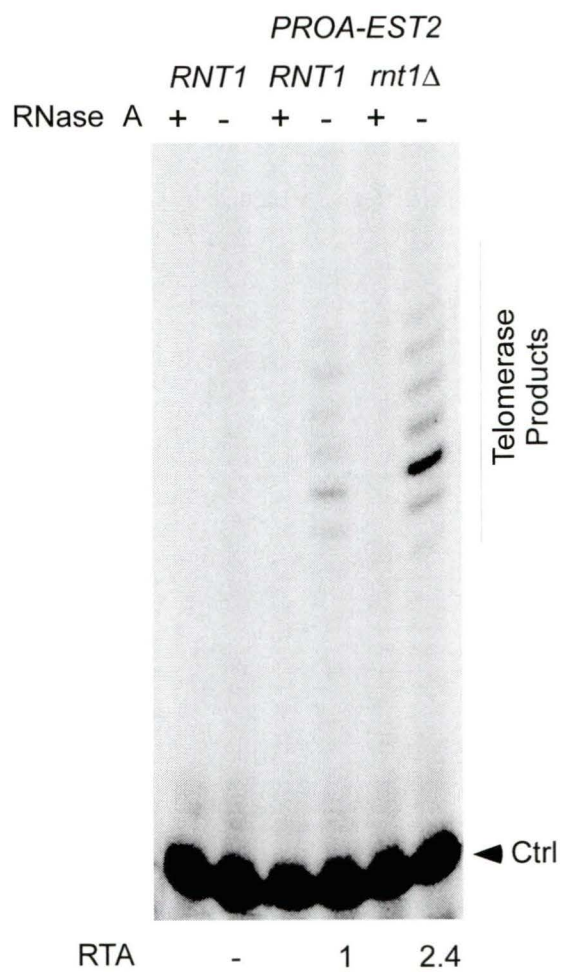
D



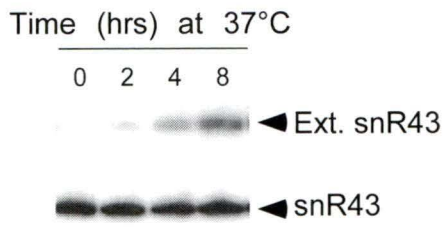
A



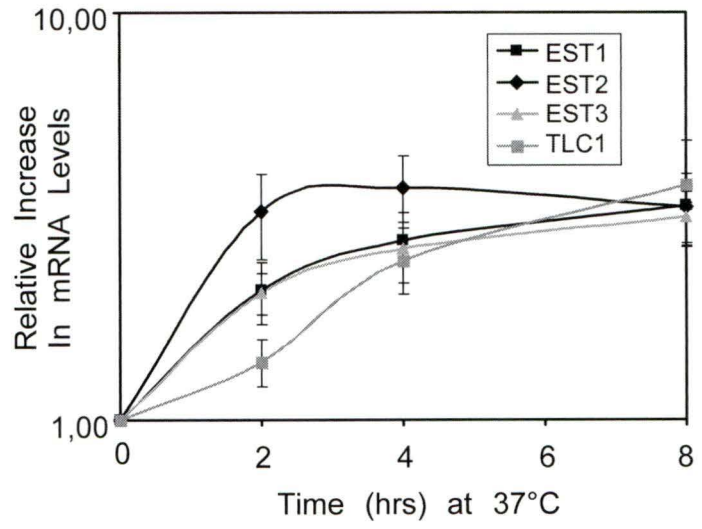
B



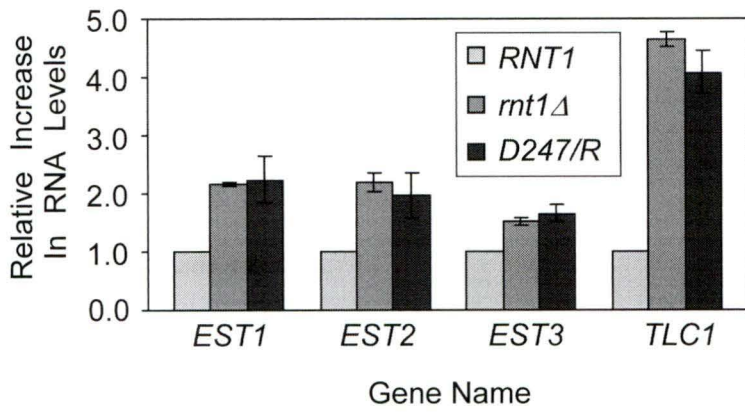
A



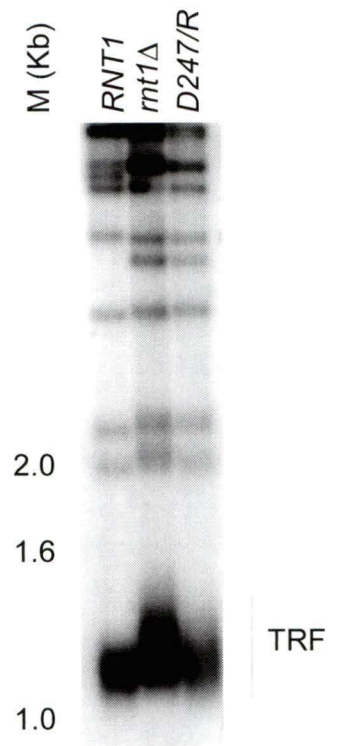
B



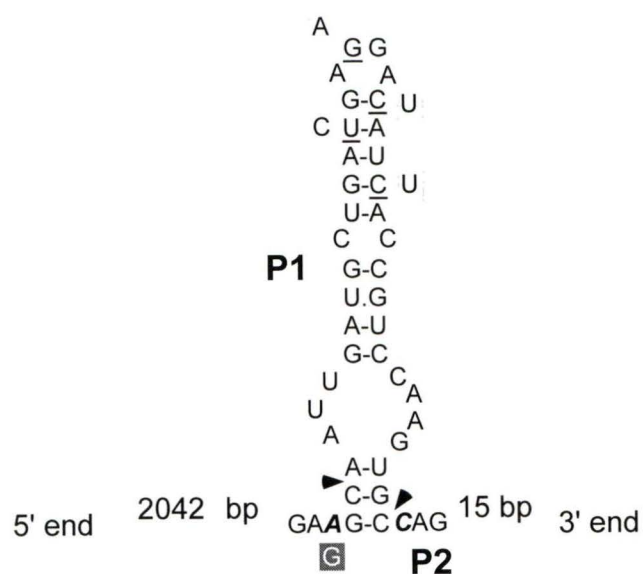
C



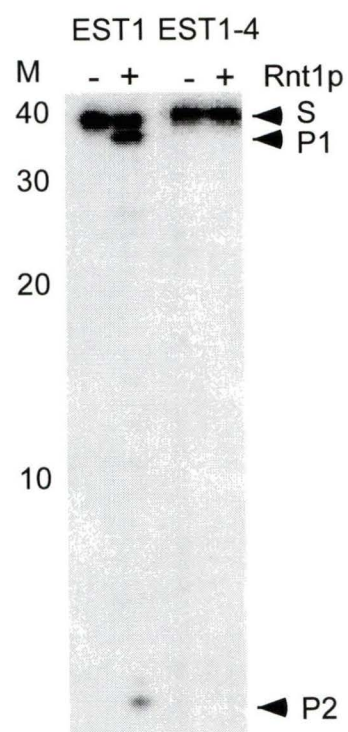
D



A



B



C

